

***Small hairpin* RNA-vermittelte Inhibierung der
Genexpression von Phosphoinositid 3-Kinasen in humanen
Neuroblastomzellen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Luise Röpke
geboren am 18.09.1983 in Rostock

Gutachter:

- 1.
- 2.
- 3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

meiner Familie gewidmet

7 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der stabilen Unterdrückung der Genexpression von Klasse-I-PI3K in der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-LO sowie ihrer phänotypischen Charakterisierung. Retro- und lentiviral wurden nicht-validierte Gene zur Produktion von shRNA zusammen mit Puromycin-Resistenzgenen in die Zellen transduziert. Anschließend erfolgte eine Selektion gegen Puromycin, sodass eine Monokultur transduzierter Zellen mit der Resistenz gegen Puromycin und den integrierten shRNA-Genen erstellt wurde. Die Zellen wurden durch immunologischen Nachweis (SDS-Page, Westernblot), Proliferationsassay (Bestimmung von Zellzahlen) und Apoptoseassay (Einbau von BrdU und FITC an Doppelstrangbrüchen mit anschließender durchflusszytometrischer Messung der FITC-Signalstärke) charakterisiert.

Dabei konnten effektive lentiviral vermittelte Inhibitionen der PI3K-Genexpressionen festgestellt werden (Senkung des Expressionsniveaus der PI3K α auf <1 %, der PI3K β auf 16 %, der und der PI3K δ auf <1 % im Vergleich zu den Kontrollen). Bei der PI3K γ konnte lentiviral nicht die angestrebte Unterdrückung der Genexpression auf <30 % erreicht werden (Senkung des Expressionsniveaus auf maximal 40 %), retroviral gelang jedoch eine Suppression auf 18 %.

Anschließend erfolgte eine zellphysiologische Analyse der erstellten Zelllinien mit den effektivsten Unterdrückungseigenschaften. Bei der Analyse des Proliferationsverhaltens konnte eine Inhibition der Proliferation bei allen PI3K-unterdrückenden Zelllinien festgestellt werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass jede der PI3K-Isoformen α , β , γ als auch δ positiv auf das Proliferationsverhalten von SK-N-LO-Zellen wirkt.

Eine gesteigerte Induktion der Apoptose (>5 % im Vergleich zu der Kontrollzelllinie) ließ sich bei den untersuchten lentiviral transduzierten Zelllinien auch nach Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium nicht nachweisen. Eine geringfügig erhöhte Apoptoserate von 1,85 % war nach Unterdrückung der Genexpression der PI3K α zu beobachten. In der Literatur wird die Induktion der Apoptose nach Inhibierung der PI3K kontrovers diskutiert. Es ist möglich, dass eine Induktion der Apoptose außerhalb des Beobachtungszeitraumes lag, da die lentiviral transduzierten Zelllinien zunächst selektiert und anschließend eine auswertbare Zellpopulation erreichen müssen. Eine Apoptosemessung an transient transfizierten Zellen würde die Messung der Apoptose zum optimalen Zeitpunkt ermöglichen. Diese könnte ohne die Integration der shRNA-Gene in das Wirtsgenom und unter Umgehen der Selektion bei

gleichzeitig höherer Effizienz des Vorganges stattfinden. Dies würde eine sofortige Auswertung der erstellten Zelllinien in Apoptoseassays zulassen.

Es lässt sich jedoch schlussfolgern, dass die zuvor beschriebene Proliferationsinhibition der Zelllinien nicht auf gesteigerte Apoptoseraten zurückzuführen ist. Vielmehr scheint die Regulation von Zellwachstum und Zellzyklus bei diesen Prozessen von Bedeutung zu sein. Zur Klärung des Sachverhaltes können weitere Untersuchungen der regulierenden Signaltransduktionsmoleküle in Erwägung gezogen werden.

Spätere Untersuchungen zur Überprüfung der Spezifität und Stabilität der Unterdrückungen durch immunologischen Nachweis zeigten jedoch, dass eine stabile Unterdrückung nur bei der PI3K γ erreicht werden konnte. Die Suppressionen aller anderen Isoformen glichen sich dem Ausgangs-Expressionsniveau an, teilweise wurden *Offtargeting*-Effekte festgestellt. Durch den Versuch einer erneuten Selektion der Zelllinien gegen Puromycin ließ sich ein Verdrängen der transduzierten Population durch nicht-transduzierten Zellen ausschließen. So sind die instabilen Expressionen am ehesten auf eine Anpassung intrazellulärer Prozesse, z.B. durch miRNA, oder beschleunigte Proliferation weniger stark unterdrückender Zellen zurückzuführen.

Ein weiterer Aspekt, dessen Untersuchung in Hinsicht auf die Unterdrückung der PI3K beim Neuroblastom von Interesse ist, stellt die Expression von Mycn dar. Ein erhöhtes Niveau dieses Proteins wird besonders mit Malignitätssteigerung des Tumors verbunden. Aus der Literatur geht hervor, dass nach Anwendung von Inhibitoren gegen die PI3K in Neuroblastomen ein reduziertes Expressionsniveau dieses Proteins beobachtet werden kann. Untersuchungen zur Analyse des Mycn-Proteinniveaus nach Unterdrückung von PI3K könnten angeschlossen werden.

Zusammenfassend bietet die Proliferationsinhibition von Neuroblastomzellen nach shRNA-vermittelter Inhibition der Genexpression von PI3K-Isoformen potentiell einen neuen therapeutischen Ansatz. Durch die selektive Unterdrückung einzelner Isoformen können eventuell schwerwiegende Nebenwirkungen umgangen werden, wie sie bisher nach Anwendung unspezifisch unterdrückender Inhibitoren auftraten. Die Effekte einer systemischen Unterdrückung von PI3K-Isoformen durch viral vermittelte shRNA müssen jedoch weiter untersucht, eine ausreichende Stabilität erreicht und eine geeignete Applikationsform zur spezifischen Wirkung im Neuroblastom-Tumorgewebe entwickelt werden.

8 Referenzen

- Arcaro A, Volinia S et al. 1998. Human phosphoinositide 3-kinase C2beta, the role of calcium and the C2 domain in enzyme activity. *J Biol Chem* 273: 33082-33090.
- Barber DF, Bartolome A et al. 2005. PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat Med* 11: 933-935.
- Barthel A, Klotz LO. 2005. Phosphoinositide 3-kinase signaling in the cellular response to oxidative stress. *J Biol Chem* 386: 207-216.
- Benistant C, Chapuis H et al. 2000. A specific function for phosphatidylinositol 3-kinase alpha (p85alpha-p110alpha) in cell survival and for phosphatidylinositol 3-kinase beta (p85alpha-p110beta) in *de novo* DNA synthesis of human colon carcinoma cells. *Oncogene* 19: 5083-5090.
- Bernstein HG, Keilhoff G et al. 1998. Tissue distribution and subcellular localization of a G-protein activated phosphoinositide 3-kinase. An immunohistochemical study. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44: 973-983.
- Bernstein E, Caudy AA et al. 2001. Role for a bidentate rebonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
- Bertino JR, Hrsg. 2002. *Encyclopedia of Cancer Vol 3 L-Q*. Zweite Aufl. San Diego: Elsevier Science, 315-321.
- Blanco-Aparicio C, Renner O et al. 2007. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* 28: 1379-1386.
- Bolesta E, Kowalczyk A et al. 2005. DNA vaccine expressing the mimotope of GD2 ganglioside induces protective GD2 cross-reactive antibody responses. *Cancer Res* 65: 3410-3418.

- Boller D, Schramm A et al. 2008. Targeting the phosphoinositide 3-kinase isoform p110 δ impairs growth and survival in neuroblastoma cells. *Clin Cancer Res* 14: 1172-1180.
- Bony C, Roche S et al. 2001. A specific role of phosphatidylinositol 3-kinase gamma. A regulation of autonomic Ca(2)+ oscillations in cardiac cells. *J Cell Biol* 152: 717-728.
- Bown N, Cotterill S et al. 1999. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 340: 1954-1961.
- Breit S, Ashman K et al. 2000. The N-myc oncogene in human neuroblastoma cells: downregulation of an angiogenesis inhibitor identified as activin A. *Cancer Res* 60: 4596-4601.
- Brodeur GM, Seeger RC et al. 1985. Amplification of N-myc sequences in primary human neuroblastomas: correlation with advanced disease stage. *Prog Clin Biol Res* 175: 105-113.
- Brodeur GM, Sawada T et al., Hrgs. 2000. Genetics of familial neuroblastoma. Amsterdam: Elsevier Science, 125-136.
- Brodeur GM. 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3: 204-216.
- Brunet A, Park J et al. 1999. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* 21: 952-965.
- Bueno MJ, de Castro IP et al. 2008. Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Landes Bioscience Journals* 7: 32-37.
- Camps M, Ruckle T et al. 2005. Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 11: 936-943.
- Cantley LC. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-1657.

- Carpenter CL, Auger KR et al. 1993. A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Mol Cell Biol* 13: 1657-65.
- Carr J, Bell E et al. 2006. Increased frequency of aberrations in the p53/MDM2/p14(ARF) pathway in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 66: 2138-2145.
- Castellino RC, Durden DL. 2007. Mechanisms of disease: the PI3K–Akt–PTEN signaling node - an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors. *Nature Clinical Practice Neurology* 3: 682-693.
- Chenn A, Walsh CA. 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297: 365-369.
- Chesler L, Schlieve C et al. 2006. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase destabilizes Mycn protein and blocks malignant progression in neuroblastoma. *Cancer Res* 66: 8139-8145.
- Cohn SL, Pearson AD et al. 2009. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 27:172-173.
- Crackower MA, Oudit GY et al. 2002. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 110: 737-749.
- D'Angio GJ, Evans AE et al. 1971. Special pattern of widespread neuroblastoma with favourable prognosis. *Lancet* 297: 1046-1049.
- David P. 1998. Retroviral vectors and lentiviral vectors. *Gene Ther* 5: 1481-1487.
- De Bernardi B, Balwierz W et al. 2005. Epidural compression in neuroblastoma: Diagnostic and therapeutic aspects. *Cancer Lett* 228: 283-299.
- Dennis PB, Jaeschke A et al. 2001. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294: 1102-1105.

Deutsches Kinderkrebsregister Mainz, Jahresbericht 1999-2000

Diehl JA, Cheng M et al. 1998. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12: 3499-3511.

Doench FJ, Petersen CP et al. 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17: 438-442.

Downes CP, Gray A et al. 2005. Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking. *Trends Cell Biol* 15: 259-268.

DuBois SG, Kalika Y et al. 1999. Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *J Pediatr Hematol Oncol* 21: 181-189.

Dummler B, Tschopp O et al. 2006. Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol Cell Biol* 26: 8042-8051.

Elbashir SM, Martinez J et al. 2001. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Genes Dev* 15: 188-200.

Engelman JA, Luo J et al. 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics* 7: 606-619.

Evans AE, Kisselbach KD et al. 2001. Effect of CEP-751 (KT-6587) on neuroblastoma xenografts expressing TrkB. *Med Pediatr Oncol* 36: 181-184.

Ferguson GJ, Milne L et al. 2007. PI(3)K γ has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. *Nat Cell Biol* 9: 86-91.

Fire A, Xu S et al. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811

- Foukas LC, Claret M et al. 2006. Critical role for the p110 α phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature* 441: 366-370.
- Franke TF. 2008. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27: 6473-6488.
- Frantz CN, London WB et al. 2004. Recurrent neuroblastoma: Randomized treatment with topotecan + cyclophosphamide (T+C) vs topotecan alone (T). A POG/CCG Intergroup Study. *J Clin Oncol* 22 (suppl): 8512 (abstr).
- Fu Y, Zhang Q et al. 2009. Inhibitory effects of adenovirus mediated Akt1 and PI3KR1 shRNA on the growth of malignant tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 8: Epub ahead of print.
- Garcia Z, Kumar A et al. 2006. Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *EMBO Journal* 25: 655-661.
- Goldsmith KC, Hogarty MD. 2005. Targeting programmed cell death pathways with experimental therapeutics: Opportunities in high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett* 228: 133-141.
- Gomperts BD. 2002. Signal Transduction. Chapter 13. Phosphoinositide 3-kinases, protein kinase B and signalling through the insulin receptor. London, San Diego: Elsevier Science.
- Gonzalez S, Naranjo A et al. 2004. Genetic engineering of cytolytic T lymphocytes for adoptive T-cell therapy of neuroblastoma. *J Gene eMed* 6: 704-711.
- Goodman LA, Liu BC et al. 1997. Modulation of N-myc expression alters the invasiveness of neuroblastoma. *Clin Exp Metastasis* 15: 130-139.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hawkins PT, Anderson KE et al. 2006. Signalling through class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochemical Society* 34: 647-661.

- Hirsch E, Katanaev LV et al. 2000. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287: 1049-1053.
- Hirsch E. 2006. Signal transduction in inflammation. Perspective clues from the leukocyte-endothelium interface. *Thromb Haemost* 95: 3-4.
- Ho R, Minturn JE et al. 2005. Proliferation of human neuroblastomas mediated by the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 65: 9868-9875.
- Ihle NT, Williams R et al. 2004. Molecular pharmacology and antitumor activity of PX-866, a novel inhibitor of phosphoinositide-3-kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 3: 763-772.
- Ihle NT, Paine-Murrieta G et al. 2005. The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor PS-866 overcomes resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib in A-549 human non-small cell lung cancer xenografts. *Mol Cancer Ther* 4: 1349-1357.
- Inoki K, Li Y et al. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4: 648-657.
- Jackson SP, Schoenwaelder SM et al. 2005. PI3-kinase p110 β : a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med* 11: 507-514.
- Jain RK, Finn AV et al. 2007. Antiantiogenic therapy for normalization of atherosclerotic plaque vasculature: A potential strategy for plaque stabilization. *Nat Clin Prac Cardiovast Med* 4: 491-502.
- Kang SS, Kwon T et al. 1999. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Bio Chem* 274: 13085-13090.
- Kang S, Bader AG et al. 2005. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 802-807.

- Kaplan S, Holbrook C et al. 1980. Vasoactive intestinal peptide secreting tumors of childhood. *Am J Dis Childhood* 134: 21-24.
- Khvorova A, Reynolds A et al. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115: 209-216.
- Knobbe CB, Trampe-Kieslich A et al. 2005. Genetic alteration and expression of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway genes PIK3CA and PIKE in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31: 486-490.
- Kong D, Yamori T. 2008. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy. *Cancer Sci* 99: 1734-1740.
- Kumar LD, Clarke AR et al. 2007. Gene manipulation through the use of small interfering RNA (siRNA): From *in vitro* to *in vivo* applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 87-100.
- Kushner BH, Kramer K et al. 2001. Phase II trial of the anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neuroblastoma. *J Clin Oncol* 19: 4189-4194.
- Lainer-Carr D, Brahn E. 2007. Angiogenesis inhibition as a therapeutic approach for inflammatory synovitis. *Nature clinica practice* 3: 434-442.
- Lee JS, Hmama Z et al. 2004. Stable gene silencing in human monocytic cell lines using lentiviral-delivered small interference RNA. *Journal Biol Chem* 279: 9379-9388.
- Lehmann K, Mueller JP et al. 2009. PI3Kgamma controls oxidative bursts in neutrophils via interactions with PKCalpha and p47phox. *Biochem J* 419: 603-610.
- Lelievre E, Bourbon PM et al. 2005. Deficiency in the p100alpha subunit of PI3K results in deminished Tie2 expression and Tie2-/- like vascular defects in mice. *Blood* 105: 3935-3938.

- Lim LP, Lau NC et al. 2003. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 17: 991-1008.
- Li, Z, Jiang H et al. 2000. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* 287: 1046-1049.
- MacDonald PE, Joseph JW et al. 2004. Impaired glucose-stimulated insulin secretion, enhanced intraperitoneal insulin tolerance, and increased beta-cell mass in mice lacking the p110gamma isoform of phosphoinositide 3-kinase. *Endocrinology* 145: 4078-4083.
- Madeddu P, Kraenkel N et al. 2008. Phosphoinositide 3-kinase gamma gene knockout impairs postischemic neovascularization and endothelial progenitor cell functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 68-76.
- Mahoney NR, Liu GT et al. 2006. Pediatric horner syndrome: etiologies and roles of imaging and urine studies to detect neuroblastoma and other responsible mass lesions. *Am J Ophthalmol* 142: 651-659.
- Maris JM, Weiss MJ et al. 2002. Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. *Cancer Res* 62: 6651-6658.
- Maris JM, Hogarty MD et al. 2007. Neuroblastoma. *Lancet* 369: 2106-2120.
- Martinez J, Patkaniowska A et al. 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 100: 563-574.
- Matthay KK, Blaes F et al. 2005. Opsoclonus myoclonus syndrome in neuroblastoma: A report from a workshop on the dancing eyes syndrome at the advances in neuroblastoma meeting in Genoa, Italy, 2004. *Cancer Lett* 228: 275-282.
- Matzke M, Aufsatz W et al. 2004. Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim Biophys Acta* 1677: 129-141.

- Medina-Tato DA, Ward SG et al. 2007. Phosphoinositide 3-kinase signalling in lung disease: Leucocytes and beyond. *Immunology* 121: 448-461.
- Meitar D, Crawford SE et al. 1996. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-Myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 14: 405-414.
- Mizoguchi M, Nutt CL et al. 2004. Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain Pathol* 14: 372-377.
- Nakagawara A, Azar CG et al. 1994. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 14: 759-767.
- Nakagawara A. 2001. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett* 169: 107-114.
- Napoli C, Lemieux C et al. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289.
- Narita M, Imai S et al. 2004. Increased level of neuronal phosphoinositide 3-kinase gamma by the activation of mu-opioid receptor in the mouse periaqueductal gray matter: further evidence for the implication in morphine-induced antinociception. *Neuroscience* 124: 515-521.
- National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology and End Results Database. <http://seer.cancer.gov> (November 2005)
- Norris MD, Bordow SB et al. 1996. Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 334: 231-238.
- Novina CD, Sharp PA. 2004. The RNAi revolution. *Nature* 430: 161-164.

- Pal-Bhadra M, Leibovitch BA et al. 2004. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science* 303: 669-672.
- Peng XD, Xu PZ et al. 2003. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev* 17; 1352-1365.
- Plantaz D, Vandesompele J et al. 2001. Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification. *Int J Cancer* 91: 680-686.
- Pho TW, Pervaiz S. 2005. LY294002 and Ly303511 sensitize tumor cells to drug-induced apoptosis via intracellular hydrogen peroxide production independent of the phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway. *Cancer Res* 65: 6264-6274.
- Pizzo PA, Poplack DG, Hrgs. 2006. Principles and practice of pediatric oncology. Fünfte Aufl. Philadelphia: JB Lippincott Company, 933-970.
- Puri KD, Doggett TA et al. 2005. The role of endothelial PI3Kgamma activity in neutrophil trafficking. *Blood* 106: 150-157.
- Quinn JJ, Altmann AJ. 1979. The multiple hematologic manifestations of neuroblastoma. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1: 201-205.
- Reya T, Clevers H. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434: 834-850.
- Rohrschneider LR, Fuller JF et al. 2000. Structure, function and biology of SHIP proteins. *Genes Dev* 14: 505-520.
- Rommel C, Camps M et al. 2007. PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat Rev Immunol* 7: 191-201.

- Rubinson DA, Dillon CP et al. 2003. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33: 401-406.
- Rubio I, Rodriguez-Viciana P et al. 1997. Interaction of Ras with phosphoinositide 3-kinase γ . *Biochem J* 326: 891-895.
- Ruckle T, Schwarz MK et al. 2006. PI3Kgamma inhibition: toward an 'aspirin of the 21st century'? *Nat Rev Drug Discov* 5: 903-918.
- Salmena L, Carracedo A et al. 2008. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 133: 403-414.
- Samuels Y, Wang Z et al. 2004. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304: 554.
- Schmidt EK, Fichelson S et al. 2004. PI3 kinase is important for Ras, MEK and Erk activation of Epo-stimulated human erythroid progenitors. *BMC* 2,7.
- Schwab M. 1993. Amplification of N-myc as a prognostic marker for patients with neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* 4:13-18.
- Sears RC, Nuckolls F et al. 2000. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* 14: 2501-2514.
- Seeger RC, Brodeur GM et al. 1985. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 313: 1111-1116.
- Shepherd PR, Withers DJ et al. 1998. Phosphoinositide 3-kinase: The key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333: 471-490.
- Shimada H, Chatten J et al. 1984. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: Definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 73: 405-416.

- Shusterman S, Grupp SA et al. 2000. Inhibition of tumor growth in a human neuroblastoma xenograft model with TNP-470. *Med Pediatr Oncol* 35: 673-676.
- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A et al. 2000. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of PI3K. *Nature* 407: 538-541.
- Skinner HD, Zheng JZ et al. 2004. Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia-inducible factor 1 γ , HDM2, and p70S6K1 in response to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *J Biol Chem* 279: 45643-45651.
- Staveley BE, Ruel L et al. 1998. Genetic analysis of protein kinase B (AKT) in *Drosophila*. *Curr Biol* 8: 599-602.
- Stephens L, Williams R et al. 2005. Phosphoinositide 3-kinases as drug targets in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 5: 357-365.
- Stoyanov B, Volinia S et al. 1995. Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269: 690-693.
- Sujobert P, Bardet V et al. Essential role for the p110 α isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood* 106: 1063-1066.
- Tacconelli A, Farina AR et al. 2004. TrkA alternative splicing: A regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 6: 347-360.
- Thompson PM, Maris JM et al. 2001. Homozygous deletion of CDKN2A (p16INK4a/p14ARF) but not within 1p36 or at other tumor suppressor loci in neuroblastoma. *Cancer Res* 61: 679-686.
- Van der Krol AR, Mur LA et al. 1990. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291-299.

- Van Haastert P, Devreotes P. 2004. Chemotaxis: Signalling the way forward. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5: 625-634.
- Vanhaesebroeck B, Welham MJ et al. 1997. P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4330-4335.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ et al. 2001. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70: 535-602.
- Vecchione C, Patrucco E et al. 2005. Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3Kgamma. *J Exp Med* 201: 1217-1228.
- Verdu J, Buratovich MA et al. 1999. Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in *Drosophila* by Akt/PKB. *Nat Cell Biol* 1: 500-506.
- Vivanco I, Sawyers CL et al. 2002. The Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Akt Pathway in human Cancer. *Nature Reviews Cancer* 2: 489-501.
- Vogt PK, Kang S et al. 2007. Cancer-specific mutations in phosphatidylinositol 3-kinase. *TRENDS in Biochemical Sciences* 32: 342-349.
- Voute PA, Hoefnagel CA et al. 1985. Detection of neuroblastoma with ¹³¹I-meta-iodobenzylguanidine. *Prog Clin Biol Res* 175: 389-398.
- Wagner LM, Crews KR et al. 2004. Phase I trial of temozolomide and protracted irinotecan in pediatric patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res* 10: 840-848.
- Weinblatt ME, Heisel MA et al. 1983. Hypertension in children with neurogenic tumors. *Pediatrics* 71: 947-957.
- Wetzker R, Rommel C. 2004. Phosphoinositide 3-Kinases as Targets for therapeutic intervention. *Current Pharmaceutical Design* 10: 1915-1922.

- White PS, Thompson PM et al. 2005. Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene* 24: 2684-2694.
- Wymann MP, Pirola L. 1998. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436: 127-150.
- Wymann MP, Marone R. 2005. Phosphoinositide 3-kinases in disease: timing, location and scaffolding. *Curr Opin Cell Biol* 17: 141-149.
- Yanik GA, Levine JE et al. 2002. Pilot study of iodine-131-metaiodobenzylguanidine in combination with myeloablative chemotherapy and autologous stem-cell support for the treatment of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 20: 2142-2149.
- Yart A, Chap H et al. 2002. PI3K in lysophosphatidic acid signaling: regulation and cross-talk with the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochim Biophys Acta* 1582: 107-111.
- Zhao L, Vogt PK. 2008. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 27: 5486-5496.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. Jörg Müller, Volker Spitzenberg,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 24. Juli 2009

Luise Röpke

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Luise Röpke
Geburtsdatum:	18.09.1983
Geburtsort:	Rostock

Schulbildung

1990-1994	Besuch der Grundschule (Große Stadtschule Rostock)
1994-2003	Besuch des Gymnasiums (Christliches Jugenddorf Christophorusschule Rostock)
2003	Abitur

Studium

2003-2004	Studium der Geowissenschaften an der Friedrich-Schiller- Universität Jena
seit 2004	Studium der Medizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2006	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Jena, den 24. Juli 2009

Luise Röpke

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meines Studiums und bei der Erstellung der Arbeit unterstützt haben.

Bei Prof. Dr. Reinhard Wetzker möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, die Arbeit am Institut für Molekulare Zellbiologie der FSU Jena anfertigen zu können, sowie für die freundliche Betreuung und Begutachtung der Arbeit.

Großer Dank für die Betreuung der Arbeit, Motivation und Geduld gilt ebenso PD Dr. Jörg Müller, dessen Meinung in vielen Bereichen hilfreich war.

Weiterhin danken möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe für umfangreiche Unterstützung für einen Mediziner, Tipps und Tricks sowie die nette Atmosphäre beim wissenschaftlichen Arbeiten, wie auch für viele Gespräche darüberhinaus beim Kaffee. Dank an Volker Spitzenberg, Christian König, Julia Schons, Deepika Arora, Nicole Mergel und Jana Hölzer für wissenschaftliche und soziale Betreuung.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mir während meiner Ausbildung viele Möglichkeiten eröffnet haben, nicht zuletzt durch die Ermöglichung dieser Arbeit. Sie und mein Freund Thorger haben mir viel Kraft gegeben, mich motiviert und unterstützt, geduldig zugehört und abgelenkt.

Ein Dank auch an alle meine Freunde in Jena und überall, die mich im Privaten unterstützt haben, viel Verständnis zeigten, da waren und mit anregenden Ideen und Gesprächen zur Seite standen.

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde(n)
kb	Kilobasen
kDa	kilo Dalton
l	Liter
min	Minute(n)
mol	molar
nt	Nukleotide
rpm	rounds per minute

Abkürzungen

4EBP	eudaryotic initiation factor 4E-binding protein
AML	akute myoblastische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	BCL2-antagonist of death
Bcl-x _L	B-cell lymphoma – extra large
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BrdU	bromierte Desoxyuridintriphosphat-Nukleotide
Btk	Bruton's Tyrosin Kinase
Ccng2	Cyclin G2
CML	chronische myoblastische Leukämie
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EGF	epidermal growth factor
ENTH	Epsin NH ₂ -terminal homology
EPC	Endothelialen Progenitorzellen

E.coli	Escherichia coli
FasL	Fas-ligand
fMLP	Formyl-Methyl-Leucyl-Phenylalanin
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FOXO	forkhead box O
FSC	forward-scatter
FYVE	Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1
GFP	grün-floureszierendes Protein
GPCR	G-protein coupled receptor
GSK3 β	glycogen synthase kinase-3 β
HIF-1 α	Hypoxie verursachender Faktor-1 α
HR	Homologe Region
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
ILK	integrin linked kinase
INGR	international neuroblastoma risk group
INSS	international neuroblastoma staging system
IRS-1	Insulin-Rezeptor-Substrat-1
LB	Luria Broth
LTR	long terminal repeats
LV	Lentivirus
MDM2	murine double minute 2
MIBG	Metaiodobenzylguanidin
miRNA	micro-RNA
mRNA	messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian target of rapamycin
MYCN	myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived
NGF	nerve growth factor
PDE3B	Phosphodiesterase 3B
PDGF	platelet derived growth factor
PDK	Phosphoinositid-abhängige Kinasen
PEA-15	phosphoprotein enriched in astrocytes-15
PI	Phosphoinositid
PI(3)P	Phosphoinositid-3-Phosphat

PI(3,4)P ₂	Phosphoinositid-3,4-Diphosphat
PI(3,4,5)P ₃	Phosphoinositid-3,4,5-Triphosphat
PI(4)P	Phosphoinositid-4-Phosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphoinositid-4,5-Diphosphat
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinasen
PH	Pleckstrin Homologie
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PTEN	Phosphatase mit Tensin-Homologie
PX	Phox
RBL2	retinoblastoma-like 2
RHEB	Ras homolog enriched in brain
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RV	Retrovirus
S6K	p70 S6 Kinase
SH2	src homology 2
SHIP	SH2-Domänen enthaltende Inositid-Polyphosphat-5-Phosphatase
SSC	side-scatter
STS	Staurosporin
TOR	target of rapamycin
TSC	tuberous sclerosis complex
TUNEL	terminal deoxynucleotide transferase dUTP nick end labeling
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINFÜHRUNG	3
2.1 Das Neuroblastom	3
2.1.1 Klinischer Aspekt	3
2.1.2 Molekularbiologischer Aspekt	5
2.1.3 Risikoeinschätzung	7
2.1.4 Therapieansätze	8
2.2 Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3K)	8
2.2.1 Funktion	9
2.2.2 Einteilung und Vorkommen	10
2.2.3 Aktivierung und Signaltransduktion	11
2.2.4 Bedeutung	13
2.2.4.1 PI3K und Tumoren	14
2.2.4.2 Weitere Aspekte	15
2.2.5 Inhibitoren	17
2.3 RNA-Interferenz	18
2.3.1 Entdeckung	18
2.3.2 Mechanismus	19
2.3.3 Bedeutung	20
2.3.4 Anwendung an Zellen <i>in vitro</i>	21
3 ZIEL DER ARBEIT	23
4 MATERIAL UND METHODEN	24
4.1 Material	24
4.1.1 Chemikalienliste	24
4.1.2 Bakterien und Plasmide	25
4.1.3 Zelllinien	26
4.1.4 Kulturmedien und Zusätze	26
4.1.5 Kits und Hilfsmittel	26

4.1.6 Primäre und sekundäre Antikörper	27
4.1.7 Lösungen und Puffer	28
4.2 Methoden	30
4.2.1 Anzucht von Bakterien	30
4.2.2 Plasmidisolierung	30
4.2.3 Zellkultur	30
4.2.3.1 Kultivierung von Zellen	31
4.2.3.2 Umsetzen von Zellen	31
4.2.3.3 Ernten von Zellen	31
4.2.3.4 Konservierung von Zellen	32
4.2.4 Unterdrückung der Genexpression	32
4.2.4.1 Produktion von Viruspartikeln	33
4.2.4.2 Infektion	34
4.2.4.3 Selektion	34
4.2.5 Proteinnachweis durch SDS-Page und Westernblot	34
4.2.5.1 SDS-Page	34
4.2.5.2 Westernblot	35
4.2.5.3 Ponceau-Färbung	36
4.2.5.4 Immunodetektion	36
4.2.5.5 Strippen von Membranen	37
4.2.6 Proliferationsassay	37
4.2.7 Apoptoseassay	38
5 ERGEBNISSE	40
5.1 Lentivirale Erstellung und Charakterisierung von PI3K α -, β -, γ - und δ -inhibierten SK-N-LO-Zellen	40
5.2 Retrovirale Erstellung und Charakterisierung einer PI3K γ -inhibierten SK-N-LO-Zelllinie	43
5.3 Charakterisierung phänotypischer Veränderungen der Zelllinie SK-N-LO- β 3 nach shRNA-vermittelter Inhibierung der PI3K β	44
5.4 Proliferationsassay und Ermittlung der Verdopplungszeiten von retro- und lentiviral transduzierten SK-N-LO-Zelllinien nach Inhibierung der PI3K α , β , γ und δ	45

5.4.1 Proliferation der lentiviral transduzierten SK-N-LO-Zelllinien	46
5.4.2 Proliferation der retroviral transduzierten SK-N-LO-Zelllinie	48
5.5 Apoptoseverhalten der lentiviral transduzierten SK-N-LO-Zelllinien nach Inhibierung der PI3K α , β , γ und δ	49
5.6 Untersuchung von Spezifität und Stabilität der lentiviral-vermittelten Inhibierungen der PI3K α , β , γ und δ in SK-N-LO-Zellen nach mehreren Passagen	52
6 DISKUSSION	55
6.1 Unterdrückung der PI3K	55
6.2 Zellmorphologische Veränderungen	57
6.3 Zellphysiologische Untersuchungen	58
6.3.1 Analyse des Proliferationsverhaltens nach Inhibierung der PI3K α , β , γ und δ in SK-N-LO-Zellen	58
6.3.2 Analyse des Apoptoseverhaltens nach lentiviraler Inhibierung der PI3K α , β , γ und δ in SK-N-LO-Zellen	60
7 SCHLUSSFOLGERUNGEN	63
8 REFERENZEN	65
Anhang	79

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Neuroblastom ist ein sympathikoadrenaler Tumor der Neuralleiste und tritt vorrangig im Neugeborenen- und Kindesalter auf. Eine besonders schlechte Prognose des Krankheitsverlaufs ist mit einer Amplifikation des Tumorsuppressorgens MYCN assoziiert. Durch Verwendung von Inhibitoren gegen die Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3K) im Mausmodell sowie deren Inhibierung durch RNA-Interferenz *in vitro* konnte in verschiedenen Arbeiten eine Inhibition des Tumorwachstums sowie eine Apoptoseinduktion des Tumorgewebes beobachtet werden. Die Bedeutung der PI3K liegt in der Weiterleitung von Signalen, welche Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Strukturierung des Zytoskeletts, vesikulärer Transport, Zellmigration und metabolische Kontrolle regulieren. Veränderte Expressionen der PI3K werden mit der Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht.

Ziel der Arbeit war es, die Klasse-I-PI3K durch retro- und lentiviral vermittelte shRNA in der Neuroblastomzelllinie vom Typ SK-N-LO spezifisch zu inhibieren. Anschließend sollte in zellphysiologischen Untersuchungen das Proliferations- und Apoptoseverhalten der erstellten Zelllinien untersucht und eine Aussage zur Stabilität und Selektivität der Unterdrückungen getroffen werden.

Dazu wurden retro- und lentivirale Partikel hergestellt, in die SK-N-LO-Zellen transduziert und eine Selektion vorgenommen, um Monokulturen transduzierter Zellen herzustellen. Es wurden Westernblots und immunologische Nachweise zur Ermittlung der Effektivität der Suppressionen, Spezifität und Stabilität angefertigt. Eine weiterführende Charakterisierung einer Auswahl der erstellten Zelllinien erfolgte in Proliferationsassays durch Bestimmung der Zellzahlen sowie in TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase dUTP nick end labeling)-Assays zur Analyse des Apoptoseverhaltens.

In den Versuchen ergab sich eine effektive Unterdrückung jeder der Klasse-I-PI3K auf <30 % der Expression der Kontrollzelllinien. Nach Inhibierung der PI3K α konnten zellmorphologische Veränderungen beobachtet werden, was durch eine Beteiligung der PI3K an der Organisation des Zytoskeletts erklärt werden kann. In den Untersuchungen zum Proliferationsverhalten zeigte sich eine deutliche Inhibition des Wachstums gegenüber den Kontrollzelllinien. Dies wurde bereits in anderen Arbeiten für die PI3K β , γ und δ sowie für Isoform-unspezifische Inhibitoren beschrieben. Es kam jedoch zu keiner verstärkten Apoptoserate der Zellen (<5 %), was in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Dies lässt die

Schlussfolgerung zu, dass die Proliferationsinhibition durch verlangsamtes Wachstum der Zellen, nicht durch erhöhte Apoptoseraten induziert war. Möglicherweise ist die Methode der stabilen shRNA-vermittelten Inhibierung der PI3K ungeeignet, um eine Einschätzung des Apoptoseverhaltens von Zellen vorzunehmen. Probleme dabei stellen die geringe Transfektionseffizienz und notwendige Selektion dar, bevor das Apoptoseverhalten an einer ausreichend großen Zellpopulation untersucht werden kann. Ein Überleben der transduzierten Zellen könnte durch alternative Signaltransduktionswege vermittelt werden. Nach ca. 5 Passagen wurden bei der Untersuchung der Spezifität und Stabilität der transduzierten Zelllinien unspezifische Unterdrückungen und Instabilität nachgewiesen. Erklärungsansätze bieten hier mögliche *offtargeting*-Effekte, endogene Regulationsmechanismen, welche der Unterdrückung der PI3K entgegenwirken, sowie Verdrängung der stark unterdrückenden Zellen durch einen Proliferationsnachteil.

Dennoch bietet die shRNA-vermittelte Inhibierung der PI3K aufgrund des reduzierten Tumorwachstums einen möglichen Ansatz zur selektiven Neuroblastom-Therapie und eine Alternative zu toxischen Inhibitoren der PI3K.

2 EINFÜHRUNG

2.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein neuronaler Tumor des sympathischen Nervengewebes. Sein Vorkommen vorrangig bei Neugeborenen und Kindern legt pathologische Prozesse in der Entwicklung und Biologie des Nervensystems nahe. Kennzeichnend für diesen Tumor sind Symptomvielfalt und Heterogenität in seinem klinischen Auftreten. So ist ein Krankheitsverlauf von spontan remittierend bis unaufhaltsam progredient möglich. Hochrisikotumoren führen nach wie vor in nur 40 % der Fälle zu langfristigen Überlebensraten. Eine Herausforderung besteht darin, das Risiko des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnose anhand relevanter Kriterien richtig einzuschätzen und eine entsprechende Therapie einzuleiten. Darüberhinaus gilt es, neue und effizientere Therapiestrategien zu entwickeln, um die Prognose der Erkrankung zu verbessern (*Bertino et al. 2002, Maris et al. 2007*).

2.1.1 Klinischer Aspekt

Eins von 7500 Lebendgeborenen leidet an einem Neuroblastom. Damit stellt es den meistvorkommenden extrakraniellen soliden Tumor bei Kindern bis 15 Jahren dar (*Pizzo und Poplack 2006*). 15 % der onkologisch bedingten Todesfälle in der Kindheit sind durch Neuroblastome verursacht (*National cancer institute 2005*, Abbildung 1).

Als sympathikoadrenaler Tumor der Neuralleiste kann er sich an jeder Stelle des sympathischen Nervensystems entwickeln. Mit 65 % ist das Abdomen die häufigste Lokalisation, 50 % davon sind in der Nebenniere lokalisiert. Weiterhin können Neuroblastome im Bereich des Halses, der Brust und des Beckens vorkommen. Unspezifische Symptome der Erkrankung sind Anämie, ein reduzierter Allgemeinzustand, Gewichtsabnahme und Fieber.

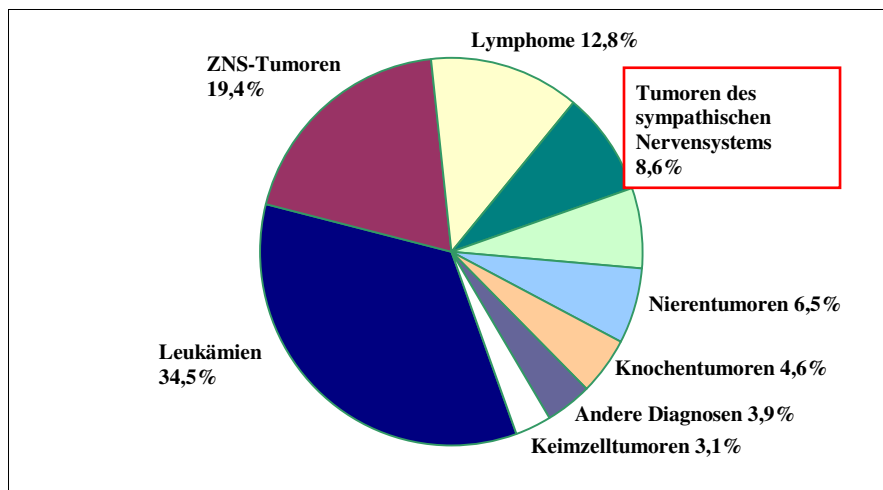


Abbildung 1: Tumorverteilung im Kindesalter. Relative Häufigkeit der gemeldeten Patienten im Alter bis 15 Jahre nach den häufigsten onkologischen Diagnosegruppen, Deutschland: 1990-1999 (nach: *Deutsches Kinderkrebsregister Mainz Jahresbericht 1999-2000*)

Es werden drei Krankheitsverläufe unterschieden und im Folgenden erläutert:

1. Lokalisiert-progredienter Krankheitsverlauf,
2. Metastasierend-progredienter Krankheitsverlauf,
3. Metastasierend-spontan remittierender Krankheitsverlauf.

Lokalisiert-progrediente Neuroblastome stellen ca. 40 % der Neuroblastomfälle. Sie können als Zufallsbefund oder durch Beschwerden wie Horner-Syndrom mit der Trias Ptosis, Miosis, Enophthalmus bei Tumoren im zervikalen Bereich (*Mahoney et al. 2006*) oder spinale Enge bei Tumoren entlang des Rückenmarks (*De Bernardi et al. 2005*) in Erscheinung treten. Symptome wie Bauch- und Rückenschmerzen, Luftnot sowie Darm- und Harnwegskomplikationen sind bei entsprechender Tumorlokalisation möglich. In 5 % der diagnostizierten Neuroblastome treten neurologische Ausfälle auf.

An metastasierend-progredienten Neuroblastomen leiden etwa 50 % der Neuroblastompatienten. Typischerweise bilden sie Tochtergeschwülste in benachbarten und entfernten Lymphknoten, in Knochen und Knochenmark sowie in der Leber. Desweiteren können Metastasen in der knöchernen Orbita auftreten, was zum charakteristischen Bild der periorbitalen Einblutung und Proptosis führt. Die Patienten leiden unter Knochenschmerzen, Lähmungen und Reizbarkeit. Im Verlauf können sich Metastasen im zentralen Nervensystem bilden. Komplikationen sind Knochenmarkersatz und Knochenmarksversagen (*Quinn und Altmann 1979*) sowie eine Renin-vermittelte Hypertension (*Weinblatt et al. 1983*).

Metastasierend-spontan remittierende Neuroblastome stellen ca. 5 % der Neuroblastomfälle bei Neugeborenen mit einem Alter von weniger als 365 Tagen und bilden Metastasen in Leber, Haut oder Knochenmark. In den meisten Fällen zeichnet sich ein sehr günstiger Krankheitsverlauf mit spontaner Remission des Tumorgewebes ab (*D'Angio et al. 1971*).

Neben den direkt tumorbedingten Symptomen können paraneoplastische Syndrome auftreten. Diese sind selten und kommen hauptsächlich bei lokalisierte Tumoren vor. Dazu gehört zum einen die Sekretion von Vasoaktivem Intestinalen Peptid (VIP), welche zu wässrigen Durchfällen und Wachstumsstörungen führt (*Kaplan et al. 1980*). Ein weiteres paraneoplastisches Syndrom des Neuroblastoms ist das Opsoclonus-Myoclonus Syndrom mit schnellen Augenbewegungen, Ataxie und irregulären Muskelbewegungen. Dieses wird bei 2-4 % der Neuroblastompatienten und besonders in frühen Stadien beobachtet (*Matthay et al. 2005*).

Die Diagnosestellung kann anhand charakteristischer histopathologischer Eigenschaften des Tumorgewebes stattfinden. Hinweise für das Vorliegen eines Neuroblastoms geben Tumorzellen in Knochenmarksaspirat oder Knochenmarksbiopsie sowie ein erhöhtes Vorkommen an Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure im Urin. Gesteigerte Konzentrationen von Serum-Laktat-Dehydrogenase, Ferritin oder Chromogranin können für ein erhöhtes Risiko im Krankheitsverlauf sprechen.

Zur apparativen Abklärung werden die Computertomographie (CT) für Tumoren des Abdomens, Beckens oder Mediastinums sowie die Magnetresonanztomographie (MRT) zur Darstellung von paraspinalen Prozessen eingesetzt. Mittels Szintigraphie kann ein Überblick über das Tumorgeschehen im Körper gegeben werden; als Radionukleotid wird das Neuroblastom-spezifische Radionukleotid Metaiodobenzylguanidin (MIBG) eingesetzt (*Voute et al. 1985*).

2.1.2 Molekularbiologischer Aspekt

Das Neuroblastom entwickelt sich aus neuronalen Stammzellen der Neuralleiste. Es besitzt die Eigenschaften der unbegrenzten Replikation und Selbsterneuerung, die sowohl für Tumoren als auch für Stammzellen typisch ist. Dabei ist der β -Catenin-Signalweg von entscheidender Bedeutung, dessen Überfunktion den Eintritt in den Zellzyklus auf Kosten der Differenzierung der Zellen ermöglicht (*Chenn und Walsh 2002, Reya und Clevers 2005*). Auch die Resistenz gegenüber Zytokinen und Todesrezeptor-vermittelter Apoptose durch

Herunterregulation von Caspase-8 und Hochregulation von PEA-15 (phosphoprotein enriched in astrocytes-15) kann bei neuronalen Stammzellen wie auch bei einem großen Teil der Neuroblastome beobachtet werden (*Goldsmith und Hogarty 2005*).

Das Neuroblastom weist eine familiäre Häufung in nur 1-2 % der Fälle auf (*Brodeur et al. 2000*). Obwohl dies wenig Hinweise auf eine genetische Vererbung gibt, sind verschiedene Genveränderungen unter den Patienten charakteristisch. Eine für das Neuroblastom typische Veränderung und gleichzeitig die am häufigsten mit einer schlechten Prognose verbundene genetische Aberration ist die 5-100-fache Amplifikation des Protoonkogens MYCN (myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived) auf Chromosom 2 mit der Lokalisation 2p24.1 (*Brodeur et al. 1985, Schwab 1993*). Sie tritt in ca. 20 % der primären Tumoren auf und bewirkt ein erhöhtes Risiko der Metastasierung und Chemotherapieresistenz (*Norris et al. 1996, DuBois et al. 1999*). Effekte der MYCN-Amplifikation sind eine erhöhte Proliferationsrate (*Seeger et al. 1985*), Downregulierung der Angiogenese-Inhibitoren (*Meitar et al. 1996, Breit et al. 2000*), Inhibition der terminalen Differenzierung sowie ein erhöhtes invasives Potential (*Goodman et al. 1997*).

Typische Genveränderungen bei der Karzinomentstehung im höheren Alter, z.B. in TP53 (*Carr et al. 2006*), in CDKN2A (*Thompson et al. 2001*) oder in Ras (*Sears et al. 2000*) sind in primären Neuroblastomen selten zu beobachten, häufig jedoch in Rezidiven.

Mehrere Chromosomen im Tumorgewebe zeigen Abweichungen vom gesunden Genom, darunter Chromosom 1 (1p36) (*White et al. 2005*), Chromosom 11 (11q14-23) (*Plantaz et al. 2001*), Chromosom 16 (16p12-13) (*Maris et al. 2002*) sowie Chromosom 17 (17q21) (*Bown et al. 1999*).

Interessant und prognoserelevant ist weiterhin der DNA-Index des Tumorgewebes bei Kindern unter 2 Jahren mit metastasierendem Neuroblastom. Es existieren 2 Varianten: ein nahezu diploider oder ein hyperploider (nahezu triploider) DNA-Gehalt. Weniger aggressive Tumoren weisen einen Defekt der Mitose auf, was zum Zugewinn oder Verlust ganzer Chromosomen und Hyperploidie führt. Tumoren höherer Malignität zeigen einen fundamentalen Defekt der genomischen Stabilität und haben genomische Neuordnungen, unbalancierte Translokationen und Beibehalt eines nahezu diploiden DNA-Gehaltes zur Folge (*Brodeur 2003*).

Wesentlich für Überleben, Wachstum und Differenzierung von neuronalen Zellen sind die über NTRK1, NTRK2 und NTRK3 kodierten Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC sowie ihre Liganden NGF (nerve growth factor), BDNF (brain derived neurotrophic factor) und Neurotrophin-3 (*Nakagawara 2001*). Hohe TrkA-Expressionen sind

charakteristisch für einen günstigen Krankheitsverlauf. TrkAIII, ein Antagonist des antionkogenetischen Signalweges NGF/TrkA, konnte in Neuroblastomzellen nachgewiesen werden (*Tacconelli et al. 2004*). TrkB mit dem Liganden BDNF wird hauptsächlich in Neuroblastomen mit MYCN-Amplifikation und schlechter Prognose beobachtet (*Nakagawara et al. 1994*).

2.1.3 Risikoeinschätzung

Es ist von Bedeutung, zur Risikoeinschätzung und Therapieplanung ein prognostisch aussagekräftiges, allgemein gültiges Klassifikationssystem heranzuziehen. Bisher fand die Einteilung der Neuroblastome auf der Grundlage des Internationalen Neuroblastom Staging Systems (INSS) statt (Tabelle 1).

Stadium	Beschreibung
1	lokalisierter Tumor, auf Ursprungsort begrenzt
2A	lokalisierter Tumor, infiltriert Umgebung, ohne die Mittellinie zu überschreiten, kein Lymphknotenbefall
2B	lokalisierter Tumor, infiltriert Umgebung, ohne die Mittellinie zu überschreiten, homolateraler Lymphknotenbefall
3	Tumor überschreitet Mittellinie, regionale Lymphknoten können beidseits befallen sein
4	hämatogene Fernmetastasen vorhanden
4S	wie 1 oder 2, aber mit Fernmetastasen in Leber, Haut sowie minimalem Knochenmarksbefall

Tabelle 1: Neuroblastomeinteilung nach dem Internationalen Staging System (INSS)

2009 wurden durch die Internationale Neuroblastom Risiko Gruppe (INRG) anhand von Daten von 8.800 Kindern mit Neuroblastom aus Europa, Japan, den USA, Kanada und Australien aus dem Zeitraum 1990 bis 2002 13 Parameter festgelegt, die aussagekräftig für die Prognose des Krankheitsverlaufes sind. Dazu zählen, aufbauend auf der Einteilung der INSS, unter anderem das Alter des Patienten bei Diagnosestellung sowie der MYCN-Status, Ploidie, Chromosom-11q-Status und Histologie (*Cohn et al. 2009*). Für die Einschätzung der Histologie spielen Neuroblastendifferenzierung, Gehalt an Schwann-Zellen, Mitosis-Karyorrhexis-Index und das Alter bei Diagnosestellung eine Rolle (*Shimada et al. 1984*). Insgesamt wird der Krankheitsverlauf hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit

evaluiert. Dabei spricht man bei einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von >85 % von einem sehr risikoarmen, zwischen 75 und 85 % Überlebenswahrscheinlichkeit von einem risikoarmen, zwischen 50 und 75 % Überlebenswahrscheinlichkeit von einem intermediären und bei einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit <50 % von einem risikoreichen Krankheitsverlauf (*Cohn et al. 2009*).

2.1.4 Therapieansätze

Als Therapieansätze werden bislang, je nach Risikoeinschätzung und Krankheitsverlauf, Operation, Chemotherapie (Cisplatin, Etoposide, Doxorubicin, Cyclophosphamid-Topotecan, Vincristin), Radiotherapie und Biotherapie (Glucokortikoide, Hormone, Immunglobulinen und Retinoide) eingesetzt. Bei günstiger Prognose im Stadium 4S kann unter Umständen auf eine Therapie verzichtet werden.

Neue Therapieansätze bestehen vor allem für die Behandlung von Hochrisiko-Tumoren. Erfolgreich werden die Topoisomerase-1-Inhibitoren Topotecan, kombiniert mit Cyclophosphamid (*Frantz et al. 2004*), und Irinotecan, kombiniert mit Temozolomid (*Wagner et al. 2004*), im Rezidivfall eingesetzt. Ein weiterer nuklearmedizinischer Ansatz besteht in der Kopplung von Radionukleotiden an MIBG (^{131}I -MIBG) in Kombination mit einer myeloablativen Therapie (*Yanik et al. 2002*). Im Bereich der Immuntherapie bietet das Disialogangliosid GD_2 Ansatzpunkte neuer Therapien, welches in den meisten Neuroblastomen hoch exprimiert ist (*Kushner et al. 2001*). An Impfstrategien (*Bolesta et al. 2005*) und zytolytischen T-Lymphozyten (*Gonzalez et al. 2004*) wird gearbeitet. Darüberhinaus werden Angiogenese-Inhibitoren entwickelt (*Shusterman et al. 2000*). Eine Hemmung von Tyrosinkinasen durch das Molekül CEP-751 (*Evans et al. 2001*) oder Inhibierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (*Ho et al. 2005*) soll das Wachstum von Neuroblastomen verlangsamen.

2.2 Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3K)

Unter Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3K) wird eine Gruppe von Lipid- und Proteinkinasen zusammengefasst. Sie nehmen eine Schlüsselfunktion bei der intrazellulären Weiterleitung von Signalen ein, was sich durch die große Zahl und Relevanz der durch sie regulierten

Prozesse widerspiegelt. Ihre Bedeutung bei grundlegenden zellulären Prozessen wie Zellwachstum, Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Strukturierung des Zytoskeletts, vesikulärem Transport, Zellmigration und metabolischer Kontrolle legen nahe, dass eine veränderte Expression oder Mutation von PI3K zur Entstehung von Krankheiten, wie u.a. Tumoren, führen kann (*Wymann und Pirola 1998, Vanhaesebroeck et al. 2001, Gomperts 2002, Hawkins et al. 2006*).

2.2.1 Funktion

PI3K katalysieren die Phosphorylierung des Inositidringes der Phospholipide Phosphoinositid (PI), Phosphoinositid-4-Phosphat (PI(4)P) und Phosphoinositid-4,5-Diphosphat (PI(4,5)P₂) an der 3'-OH-Position unter Verwendung von ATP (Adenosintriphosphat) (*Cantley 2002, Hawkins et al. 2006*, Abbildung 2). Dabei entstehen Phosphoinositid-3-Phosphat (PI(3)P), Phosphoinositid-3,4-Diphosphat (PI(3,4)P₂) und Phosphoinositid-3,4,5-Triphosphat (PI(3,4,5)P₃). An PI(3,4,5)P₃ können zwei weitere Enzyme wirken: die Phosphoinositid-Lipid-3-Phosphatase PTEN (Phosphatase mit Tensin-Homologie) dephosphoryliert PI(3,4,5)P₃ und PI(3,4)P₂ an der 3'-Position (*Cantley 2002*) und ist damit Antagonist der PI3K; die SH2-Domänen enthaltende Inositid-Polyphosphat-5-Phosphatase (SHIP) dephosphoryliert PI(3,4,5)P₃ an Position 5 und erzeugt PI(3,4)P₂. Verlust oder Mutation von PTEN hat in der Entstehung von Tumoren Bedeutung. Damit gilt dieses Protein als Tumorsuppressor (*Blanco-Aparicio et al. 2007, Salmena et al. 2008*). SHIP nimmt eine wesentliche Funktion bei der Aufrechterhaltung des Immunsystems und Vermeidung von Autoimmunität ein (*Rohrschneider et al. 2000*).

Die PI3K besitzen Homologe Regionen (HR), an denen die Lipidsubstrate, Phosphoinositidgruppen und ATP binden. Dabei stellt HR1 eine Kinasedomäne, HR2 eine helikale Domäne und HR3 eine C2-Domäne dar. Bei der PI3K Klasse II (siehe Kapitel 2.2.2) existiert eine zusätzliche C-terminale C2 Domäne. Eine weitere Ras-Bindedomäne wird als HR4 bezeichnet und kommt nur bei PI3K der Klasse I und II (siehe Kapitel 2.2.2) vor.

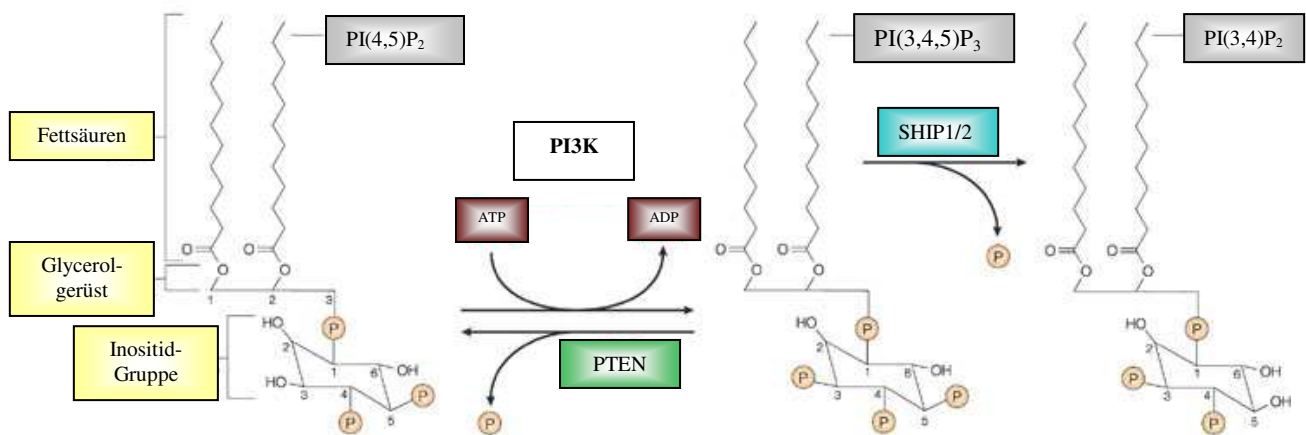


Abbildung 2: Funktion der Enzyme PI3K, PTEN und SHIP (nach: Vivanco et al. 2002)

2.2.2 Einteilung und Vorkommen

Basierend auf ihren strukturellen und funktionellen Homologien wird eine Einteilung der PI3K in drei Klassen vorgenommen.

Klasse-I-PI3K sind Heterodimere von einer aus vier katalytischen Untereinheiten (p110 α , p110 β , p110 γ und p110 δ) sowie einer regulatorischen Untereinheit. Sie phosphorylieren PI, PI(4)P und, als einzige und mit einer gewissen Selektivität, PI(4,5)P₂. Anhand der katalytischen Untereinheit wird die grobe Einteilung in Isoformen vorgenommen; anhand der regulatorischen Untereinheiten kann eine weitere Unterteilung in Klasse IA und Klasse IB erfolgen. Dabei verbindet sich bei der Klasse IA eine der p50-55/p85 regulatorischen mit einer der katalytischen Untereinheiten p110 α , p110 β oder p110 δ . Bei der nur in Säugetieren vorhandene Klasse IB kommt es zur Dimerisierung der p110 γ katalytischen mit einer der regulatorischen Untereinheiten p101 oder p84. Die PI3K α und β werden ubiquitär exprimiert, während die PI3K γ und δ in bestimmten Zellen vorkommen, so in Zellen hämatopoetischen Ursprungs (Stoyanov et al. 1995, Vanhaesebroeck et al. 1997), in Prostata, Nieren, Speicheldrüsen und exokrinem Pankreas (Bernstein et al. 1998), Endothelzellen (Arcaro et al. 1998), Kardiomyozyten (Bony et al. 2001), erythroiden Vorläuferzellen (Schmidt et al. 2004), den Langerhansschen Inseln des Pankreas (MacDonald et al. 2004) sowie Neuronen (König et al. mündliche Mitteilung, Narita et al. 2004).

Klasse-II-PI3K sind Monomere von 170-210 kDa und umfassen drei Gruppen: α , β und γ . Sie phosphorylieren PI und PI(4)P. Klasse-III-PI3K dient nur PI als Substrat, ihr einziger bekannter Vertreter ist Vps34p. Im Weiteren sollen die Klasse-I-PI3K betrachtet werden.

2.2.3 Aktivierung und Signaltransduktion

Die Aktivierung der Klasse-IA-PI3K findet durch extrazelluläre Moleküle statt, dazu zählen Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), NGF und IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) sowie Insulin. Die Vermittlung erfolgt über die regulatorische Untereinheit. Diese besitzt zwei SH2-Domänen (Src homology 2 domains), eine Inter-SH2-Region, die zur Bindung an die PI3K führt, sowie mindestens eine prolinreiche Region. Die SH2-Domänen sind in der Lage, phosphorylierte Tyrosinreste aktivierter Rezeptortyrosinkinasen zu erkennen.

Die Aktivierung der Klasse-IB-PI3K, sowie der PI3K β auf alternativem Weg, erfolgt über Bindung von $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktivierter heterotrimerer G-Proteine direkt an die katalytische Untereinheit der PI3K. Alle PI3K der Klasse I und II können durch Ras aktiviert werden (*Rubio et al. 1997*).

Nach der Aktivierung erfolgt die Ras-vermittelte Translokation des Moleküls und Bindung an die Plasmamembran, wo die wesentliche Funktion in der Phosphorylierung der Lipidsubstrate besteht. Sie vermitteln die Signalweiterleitung als *second messenger*. Eine zusätzliche Serin/Threonin-Proteinkinaseaktivität ist beschrieben, welche zur Autophosphorylierung führt und im Fall der Klasse-I-PI3K eine Inhibition der Lipidkinaseaktivität vermittelt (*Carpenter et al. 1993*). Weitere exogene Proteine wie IRS-1 (Insulin-Rezeptor-Substrat-1), PDE3B (Phosphodiesterase 3B), 4EBP (eudaryotic initiation factor 4E binding protein) und H-Ras können durch Klasse-IA-PI3K phosphoryliert werden.

Über die PI-Bindedomänen FYVE (Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1), PX (Phox), ENTH (Epsin NH2-terminal homology) und PH (Pleckstrin-Homologie) der PI3K-vermittelten Phospholipide können eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine aktiviert werden. Dabei besitzt die PH-Domäne zur Bindung an PI3K die weiteste Verbreitung und ist in weit mehr als 100 Proteinen zu finden (*Downes et al. 2005, Wymann und Marone 2005*). Zu diesen Proteinen zählen u.a. Guanin-Austauschfaktoren für Rac, Tec-Kinasen, darunter Btk (Bruton's Tyrosin Kinase), Phospholipase C γ , PDK1 (Phosphoinositid abhängige Kinase 1), ILK (integrin

linked kinase), PKC (atypische Proteinkinase C) sowie Akt (auch PKB (Proteinkinase B) genannt) über PDK1 und PDK2 (Wymann und Pirola 1998, Wymann und Marone 2005). Die Aktivierung von Akt gilt als einer der Hauptwege der PI3K-Signalvermittlung und stellt einen stark evolutionär konservierten Weg dar. In Säugetierzellen kommen 3 verwandte Akt-Formen vor, die sich in ihren Lokalisationen unterscheiden. So wird Akt-1 ubiquitär exprimiert, Akt-2 vorrangig in Insulin-sensitiven Geweben (Leber, Muskel, Fettgewebe) und Akt-3 vorrangig in Gehirn und Testis, in geringeren Mengen auch in intestinalen Organen und Muskelgewebe (Franke 2008).

Über den komplexen Akt-Signalweg kommt es durch Phosphorylierung von Proteinen zu einer Vielzahl von Effekten (Abbildung 3).

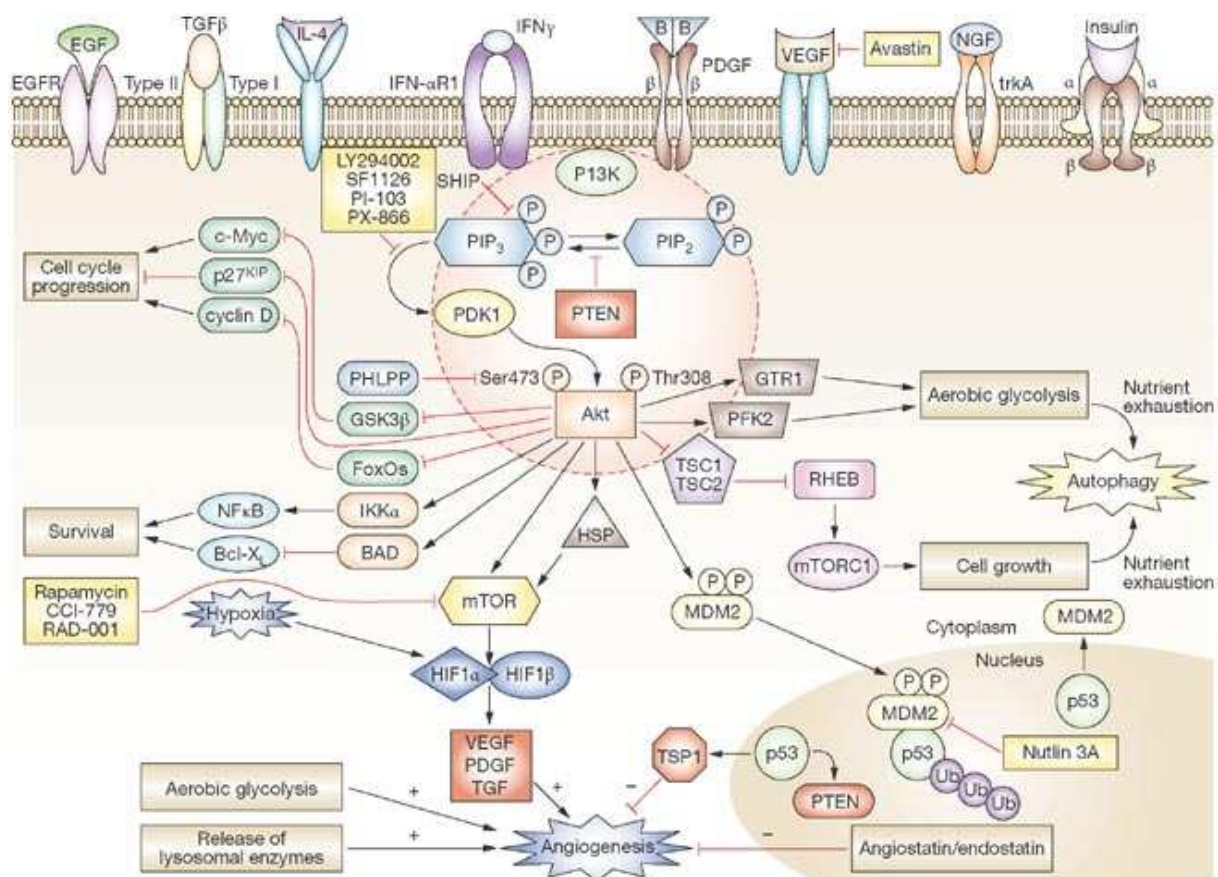


Abbildung 3: Signaltransduktion der Klasse I PI3K (aus: Castellino und Durden, 2007)

Die Aktivität von Akt hat Auswirkungen auf existentielle Mechanismen in der Zelle. So wird u.a. mTORC1 (mammalian target of rapamycin) über die Akt-vermittelte Inhibition von TSC1/2 (tuberous sclerosis complex) und RHEB (Ras homologue enriched in brain) indirekt aktiviert, phosphoryliert und nimmt damit Einfluss auf das Zellwachstum. Die direkte Aktivierung von mTOR hat einen Effekt auf Zellwachstum und Angiogenese. Es handelt sich

dabei um eine Serin/Threonin-Kinase, welche die Proteinsynthese einer Zelle dem Nährstoffangebot anpasst (*Dennis et al. 2001*). mTOR reguliert über Aktivierung der p70S6-Kinase und Inhibition von 4EBPI die Translation von mRNA. Eine Inhibition von mTOR kann indirekt über Inhibitoren der PI3K sowie direkt über Rapamycin vorgenommen werden. Für die Regulation der Zellteilung sind Zellzyklus-Proteine verantwortlich. So kann über den PI3K-Akt-Weg GSK3 β (glycogen synthase kinase-3 β) phosphoryliert werden, was zu seiner Inaktivierung führt. Dies verhindert die Degradierung der Zellzyklus-induzierenden Proteine Cyclin D1 und c-Myc. Über Akt kann das Eintreten in den Zellzyklus induziert werden, indem über die Inhibition von FOXO (forkhead box O) die Transkription weiterer Zellzyklusinhibitoren verhindert wird. Dazu zählen p27^{Kip1}, RBL2 (retinoblastoma-like 2) und Ccng2 (Cyclin G2). Die Inaktivierung von p27^{Kip} kann auch direkt über Akt vermittelt werden. Weiterhin findet über die Akt-vermittelte Phosphorylierung von MDM2 (murine double minute 2) die Degradation des Tumorsuppressorgens p53 und damit Einflussnahme auf das Apoptoseverhalten von Zellen statt (*Engelman et al. 2006*).

Das Apoptoseverhalten kann über weitere PI3K-Akt-vermittelte Signalwege beeinflusst werden. So kann die Inaktivierung des proapoptotischen Proteins BAD (BCL2-antagonist of death) vermittelt werden. BAD ist für die Inhibition antiapoptotischer Proteine wie Bcl-x_L (B-cell lymphoma – extra large) und anderer Mitglieder der Bcl-2 Familie verantwortlich. Weiterhin kommt es über FOXO zur Inhibition von Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription von proapoptotischen Genen wie FasL (Fas-ligand) und Bim (BCL2-like 11) regulieren. Es gibt darüberhinaus Hinweise auf eine Verbindung zwischen dem PI3K-Akt-Weg und den SAPK/MAPK-Kaskaden, welche durch eine Vielzahl an zellulären Stressfaktoren initiiert und mit Apoptose in Verbindung gebracht werden (*Franke 2008*).

2.2.4 Bedeutung

Die multiplen Aktivierungsmöglichkeiten und weitreichende Effektvermittlung führen zur Bedeutung der PI3K in vielen pathologischen Systemen (*Wetzker und Rommel 2004*). Im Folgenden soll ein kurzer Überblick genügen und besonders die Funktion in der Entstehung von Tumoren dargestellt werden.

2.2.4.1 PI3K und Tumoren

Tumorgewebe besitzt typische Eigenschaften wie autonomes Wachstum der Zellen, fehlende Sensitivität gegenüber Wachstumsinhibition, verändertes Apoptoseverhalten, Immortalisierung und die Möglichkeit zu Angiogeneese und Invasion (*Hanahan und Weinberg 2000*). Aufgrund der in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Vermittlung zellulärer Wachstumssignale durch PI3K und ihre daraus resultierende Bedeutung bei Prozessen wie Zellwachstum, Zellteilung, Apoptoseverhalten sowie Immortalisierung (*Kang et al. 1999*), Angiogeneese und Invasion (*Lelievre et al. 2005*) liegt die Vermutung nahe, dass sie wesentlich an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind (*Foukas et al. 2006, Zhao et al. 2008*). So sind in Tumorgeweben Mutationen und transkriptionelles Silencing des PI3K-Antagonisten und Tumorsuppressorgens PTEN beobachtet worden. Darüberhinaus findet man erhöhte Expressionen und Mutationen von PI3K-Isoformen sowie Akt in malignen Tumoren. Auch Mutationen von TSC1/2 sind in benignen Tumoren beobachtet worden (*Vivanco und Sawyers 2002, Inoki et al. 2002, Samuels et al. 2004, Stephens et al. 2005, Wymann und Marone 2005, Tabelle 2*).

Gewebe	Mutation
Gehirn	PTEN, p110
Schilddrüse	PTEN, Akt
Haut	PTEN
Lunge	PTEN, Akt
Lymphknoten	PTEN, p85
Brust	PTEN, Akt, p110
Magen	Akt, p110
Pankreas	Akt
Leber	PTEN
Kolon	Akt, p85, p110
Nieren	PTEN
Prostata	PTEN, Akt
Ovar	Akt, p85, p110
Endometrium	PTEN, Akt

Tabelle 2: Tumoren mit häufigen Mutationen im PI3K-Signalweg (nach *Garcia et al. 2006*)

Bei der Betrachtung der PI3K-Isoformen im Tumorgewebe ist eine hohe Anzahl an Mutationen des p110 α -kodierenden PIK3CA-Gens auffällig. Diese Mutationen betreffen 30% der Tumoren von Brust, Prostata, Kolon und Endometrium, zu einem geringeren Prozentsatz

auch andere Gewebe (*Samuels et al. 2004*). 80% der Mutationen sind in drei sogenannten *hot spots* lokalisiert. Zwei davon liegen in der helikalen Domäne von p110 α (E542K und I545K), eine andere in der Kinase-Domäne (H1047R); die anderen 20 % stellen über das Gen verteilte Mutationen dar. Alle haben eine vermehrte Expression von p110 α zur Folge (*Kang et al. 2005*).

Weiterhin existieren Hinweise, dass auch die übrigen Isoformen der PI3K in Tumorgeweben überexprimiert sein können, jedoch ist kein Bezug zur Onkogenese herstellbar, da keine Mutationen der Gene auftreten, welche die Überexpression und Tumoreigenschaften des Gewebes erklären würden (*Vogt et al. 2007*). So wurde eine Überexpression der PI3K δ in Akuter Myeloischer Leukämie (AML) beobachtet, die Überexpression der PI3K γ in Chronischer Myeloischer Leukämie (CML). Weitere Gewebe mit Überexpression der Isoformen β , γ und δ sind Blase, Gehirn und Kolon (*Benistant et al. 2000, Mizoguchi et al. 2004, Knobbe et al. 2005, Sujobert et al. 2005*).

Darüberhinaus konnte eine Induzierbarkeit von Angiogenese in Tumoren über HIF-1 α (Hypoxie verursachender Faktor-1 α) und VEGF durch den Signalweg der PI3K beobachtet werden (*Skinner et al. 2004*).

Hervorzuheben ist die Bedeutung der PI3K in Neuroblastomen. Dies konnte durch eine Arbeit am Tiermodell gezeigt werden, in welcher durch Applikation eines PI3K-Inhibitors das Wachstum der Tumore aufgehalten wurde. Die untersuchten Neuroblastome wiesen eine Amplifikation des Protoonkogens MYCN (siehe Kapitel 2.1.2) auf. Durch den Inhibitor kam es neben der Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest über die Aktivierung von GSK3 β zu einer Phosphorylierung und Destabilisation der Mycn-Proteinlevel (*Chesler et al. 2006*).

2.2.4.2 Weitere Aspekte

Neben ihrer Bedeutung in Tumorgewebe werden durch die PI3K eine Vielzahl weiterer Effekte vermittelt. Dazu zählt u.a. die Insulin-abhängige Glucoseaufnahme in Adipozyten über den Insulinrezeptor (*Shepherd et al., 1998*), die Regulation von oxidativem Stress durch PI3K (*Barthel und Klotz 2005, Lehmann et al. 2009*) sowie die Beteiligung der PI3K γ in Herzmuskelgewebe an der Kontraktilität von Kardiomyozyten (*Crackower et al. 2002*).

Bei der Betrachtung des Immunsystems sind besonders die PI3K γ und PI3K δ von Interesse. Durch die Bedeutung dieser PI3K bei inflammatorischen, besonders autoimmunen Prozessen werden große Hoffnungen auf ihre Regulation als Ansätze einer therapeutischen Behandlung

gesetzt (*Ruckle et al. 2006*). In Tierexperimenten konnte festgestellt werden, dass Mäuse mit einem Knockout der PI3K γ und PI3K δ – im Gegensatz zu Mäusen, denen die Gene für die PI3K α und PI3K β fehlen und schon im Fetalstadium versterben – vital und in der Lage zur Fortpflanzung sind. Jedoch kommt es zu Einschränkungen der Zellantwort auf Stimuli des vorrangig PI3K γ -assoziierten GPCR (G-protein coupled receptor) durch Chemokine, aktivierte Komplementfragmente und fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), welche immunologische Informationen vermitteln (*Li et al. 2000, Hirsch et al. 2000*). Dies hat Einfluss auf die Chemotaxis verschiedener Leukozyten, dendritischer Zellen und Makrophagen zu den GPCR-stimulierenden Chemokinen. So wird u.a. vermutet, dass PI3K γ für Gradient-unabhängige Zellbewegung verantwortlich ist und die Migrationsfront organisiert und stabilisiert (*Ferguson et al. 2007*). Es kommt zur Entstehung von Erkrankungen wie Asthma und Atemwegsentzündungen (*Medina-Tato et al. 2007*), Rheumatoider Arthritis (*Camps et al. 2005, Rommel et al. 2007*), Allergien (*Hirsch 2006*), systemischen Lupus erythematoses (*Barber et al. 2005*), Lungenerkrankungen und Pankreatitis.

Neben der Chemotaxis sind die in Gefäßen lokalisierten PI3K von Bedeutung. So beeinflussen PI3K γ und PI3K δ in Endothelien die Adhäsion und Migration von Neutrophilen durch die Gefäßwände (*Puri et al. 2005*). Durch die Wirkung auf endotheliale Progenitorzellen nimmt die PI3K γ Einfluss auf die Vaskulogenese (*Madeddu et al. 2008*), was einer Beteiligung an Krankheiten wie Artherosklerose und Arthritis führt (*Lainer-Carr et al. 2007, Jain et al. 2007*). In Scherstress-exponierten vaskulären Endothelzellen wird durch Akt die Stickstoffmonoxid-Synthase aktiviert, was über die Bildung von Stickstoffmonoxid zur Relaxation glatter Gefäßmuskulatur führt (*Vecchione et al. 2005*). Eine Bedeutung der PI3K γ bei anaphylaktischen Reaktionen wird vermutet (*Hirsch 2006*). Die PI3K β aktiviert darüberhinaus Thrombozyten und hat damit Einfluss auf die Gerinnung und Entstehung von Thromben (*Jackson et al. 2005*).

Eine Dysregulation von Akt wird auch in geistigen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Chorea Huntington beobachtet und darüberhinaus mit spinocerebellärer Ataxie und Schizophrenie in Verbindung gebracht (*Franke 2008*). Über eine Funktion des Moleküls in höheren Hirnfunktionen in Bezug auf Kognition wird diskutiert.

2.2.5 Inhibitoren

Zum besseren Verständnis der Wirkung von PI3K sowie für therapeutische Ansätze wurden eine Reihe von Inhibitoren entwickelt, die sich durch Selektivität für einzelne PI3K-Isoformen und die Behandlung möglicher Zielerkrankungen unterscheiden (Kong und Yamori 2008, Tabelle 3).

Inhibitor	Selektivität	Zielerkrankung
Wortmannin	Pan-PI3K-Inhibitor, mTOR und DNA-PK-Inhibitor, MLCK-Inhibitor	Krebs
LY294002	Pan-PI3K-Inhibitor, mTOR und DNA-PK-Inhibitor, CK2-Inhibitor	Krebs, Tumorangiogenese
AS-605240	PI3K γ -selektiv	Rheumatoide Arthritis, Glomerulonephritis
IC87114	PI3K δ -selektiv	Entzündungen, Allergien, AML
TG100-115	PI3K γ - und PI3K δ -selektiv	Myokardinfarkt
TGX221	PI3K β -selektiv	Thrombose
PX-866	Pan-PI3K-Inhibitor	Krebs
PI-103	Pan-PI3K-Inhibitor, mTOR und DNA-PK-Inhibitor	Krebs, Tumorangiogenese
NVP-BEZ235	Pan-PI3K-Inhibitor, mTOR-Inhibitor	Krebs
SF1126	Vorstufe von pan-PI3K-Inhibitor, Vorstufe von mTOR und DNA-PK-Inhibitor	Krebs, Tumorangiogenese
ZSTK474	Spezifischer pan-PI3K-Inhibitor, keine Inhibition von mTOR und DNA-PK	Krebs

Tabelle 3: PI3K-Inhibitoren. Übersicht über die wesentlichen Inhibitoren der PI3K mit ihrer Selektivität und Zielerkrankung (nach: Kong und Yamori 2008)

Neben den vielversprechenden Wirkungen bei *in vivo* Applikation der Inhibitoren wie Inhibition des Zellwachstums sowie antiinflammatorische, zellwachstumsmindernde und tumorinhibitorische Effekte zeigen besonders die ursprünglichen Hemmstoffe wie der fungale Metabolit Wortmannin oder das synthetisch hergestellte LY294002 starke Nebenwirkungen, weshalb sie für eine klinische Anwendung nicht geeignet sind. LY294002 verursacht toxische

Effekte an der Haut, die auf die Induktion von Apoptose bei Produktion von ROS zurückgeführt wird (*Pho und Pervaiz 2005*). Die Anwendung von Wortmannin führt zu Nekrotisierung von Lymphgewebe, schweren myokardialen Blutungen und Hämoglobinurie sowie Schädigungen an der Leber (*Ihle et al. 2004*). Der aus Wortmannin hervorgehende, weniger lebertoxische Metabolit PX-866 führt zu Hyperglycämie mit verminderter Glukosetoleranz (*Ihle et al. 2005*). Die Inhibitoren AS-605240, IC87114, TG100-115, TGX-221, PI-103, NVP-BEZ235, SF1126 und ZSTK474 sind zum großen Teil von Wortmannin und LY294002 abgeleitet und antagonisieren zum Teil spezifisch einzelne, zum Teil mehrere Isoformen. Sie werden aufgrund bislang ausbleibender toxischer Nebenwirkungen in klinischen Studien getestet.

2.3 RNA-Interferenz

Die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) in den 1990er Jahren erweiterte das Verständnis genetischer Prozesse in Organismen. Eine durch kurze RNA-Moleküle induzierte Inhibierung von Genen spielt bei Prozessen wie der Genregulation und Stammzellerhaltung eine wesentliche Rolle. Sie stellt einen wahrscheinlich genetisch konservierten zellulären Abwehrmechanismus gegen eine Infektion durch Viren dar. Das Phänomen der RNA-Interferenz kann wissenschaftlich genutzt werden, um die Funktionalität verschiedener Gene zu untersuchen und bietet darüber hinaus potentiell neue therapeutische Ansätze (*Novina et al. 2004, Kumar et al. 2007*).

2.3.1 Entdeckung

1990 beobachteten Pflanzenbiologen, dass Petunien, in welchen ein Gen für besonders tief violette Farbe amplifiziert wurde, statt einer intensiven Färbung ein eher fleckig bis weißes Erscheinungsbild aufwiesen (*Napoli et al. 1990, van der Krol et al. 1990*). Das zugrundeliegende Prinzip dieser Beobachtungen konnten Fire und Mello einige Jahre später an einem Tiermodell erklären und beschrieben damit erstmalig die RNA-Interferenz. Über die Injektion von dsRNA (Doppelstrang-RNA) in den Wurm *Caenorhabditis elegans* kam es zu einer Herunterregulation des Gens, dessen Gensequenz komplementär zur Sequenz der

zugeführten dsRNA war (*Fire et al. 1998*). 2006 wurden sie für diese Entdeckung mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

2.3.2 Mechanismus

Der Mechanismus der Unterdrückung von Genen durch RNA-Interferenz beruht auf dem Abbau von mRNA (messenger-RNA) und dadurch fehlende Proteinsynthese (Abbildung 5). In die Zelle wird von außen RNA eingeführt, bei der es sich häufig um shRNA (small hairpin RNA) mit einem selbstkomplementären, effektiv geformten Einzelstrang handelt (Abbildung 4). Die interferierende RNA wird durch das Enzym Dicer aus der RNase-III-Familie so geschnitten, dass ein Doppelstrang-RNA-Molekül von je 21-23 Nukleotiden Länge mit 3'-Überhängen entsteht (*Elbashir et al. 2001, Bernstein et al. 2001*). Man bezeichnet sie als siRNA (short interfering RNA).



Abbildung 4: Aufbau eines shRNA-Moleküls

Der Doppelstrang der siRNA spaltet sich zu einem kodierenden Strang mit identischer Sequenz zum Ziel-Gen und einem komplementären Strang. Letzterer bewirkt eine Bindung des Nukleaseaktivität-besitzenden RISC-Komplexes (RNA induced silencing complex) mit der mRNA des Ziel-Gens über Basenpaarung und führt zur Degradierung der mRNA (*Martinez et al. 2002, Khvorova et al. 2003*).

Der Vorgang der Genunterdrückung kann neben dem Abbau der mRNA auch auf der Ebene der Transkription und Translation stattfinden (*Doench et al. 2003*).

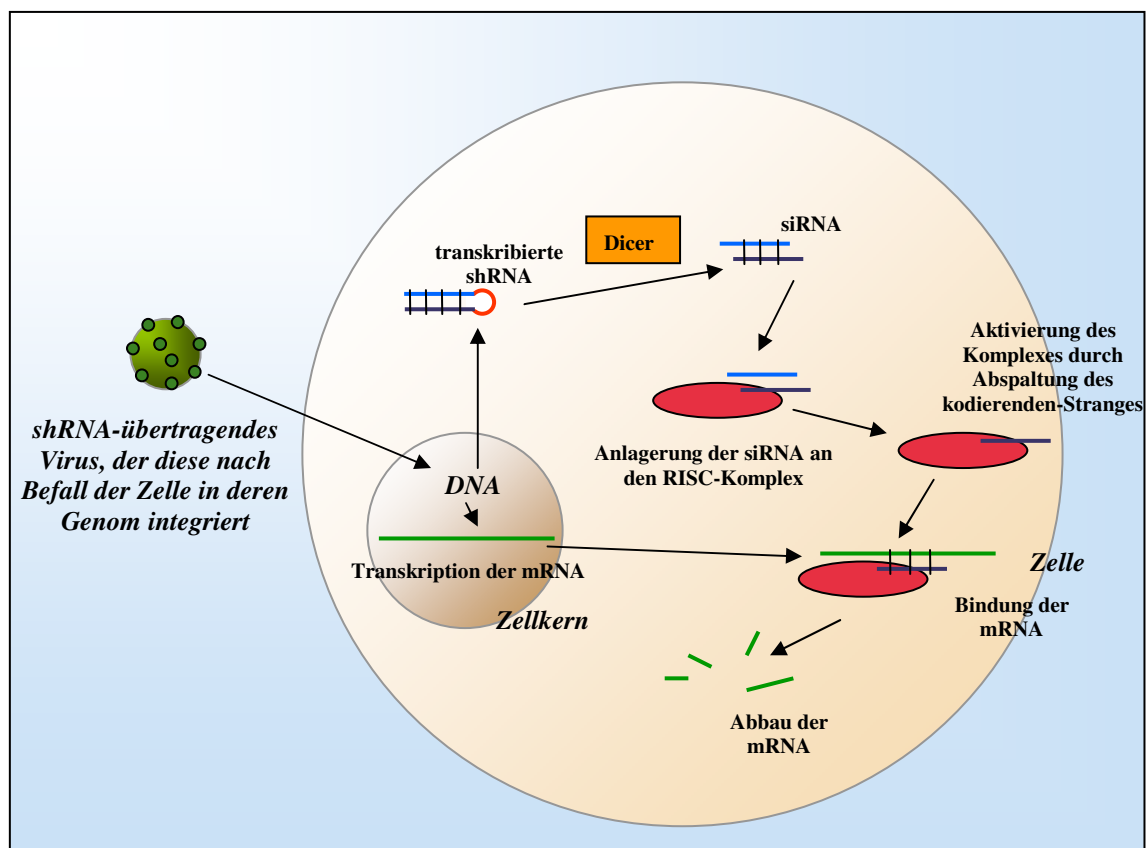


Abbildung 5: Prinzip der RNA-Interferenz durch viral vermittelte shRNA

Eine Form der endogenen RNA-Interferenz wurde durch miRNA (micro-RNA) beobachtet, welche im Genom kodiert ist und in Größenordnungen von 800-1000 Molekülen pro Zelle auftritt. Durch sie besitzt die Zelle die Fähigkeit, mehr als 30 % der Protein-kodierenden Gene zu regulieren (*Lim et al. 2003*). Es handelt sich um nicht-kodierende RNA-Moleküle von 18-25 nt Länge, deren Ziele und Art der Unterdrückung sich von der siRNA unterscheiden. So wird über die Polymerase II und III pri-miRNA transkribiert, welche in weiteren Schritten durch die RNase III-Enzyme Drosha und Dicer in miRNA prozessiert wird. Über den RISC-Komplex wird transkriptionelle Degradation oder translationale Inhibition induziert. Ihre Funktion besteht u.a. in der Kontrolle der Zelldifferenzierung, Proliferation, Apoptose, Entwicklung, Immunität, Metabolismus und Erhaltung von Stammzellen (*Bueno et al. 2008*).

2.3.3 Bedeutung

Die RNA-Interferenz dient der Regulation der Genexpression in unterschiedlichen Geweben (*Pal-Bhadra et al. 2004*). Zusammen mit Transkriptionsfaktoren bestimmen sie die

intrazellulären Proteinexpressionen. Sie stellt weiterhin einen Mechanismus zur Abwehr von Viren dar, was zu mehr genetischer Stabilität der Zellen führt (*Matzke et al. 2004*).

Für wissenschaftliche Untersuchungen kann das Prinzip der RNA-Interferenz für gezielte und selektive Genunterdrückung genutzt und dadurch die Funktion der Gene und Proteine betrachtet werden. Vorteile sind dabei bessere Steuerbarkeit und schnellere, kostengünstigere Umsetzung verglichen mit genetischen Knockouts. Es wird lediglich eine Herunterregulation von Genen statt eines vollständigen Knockouts erzielt. Bei essentiellen Genen kann eine lediglich partielle Genunterdrückung die Lebensfähigkeit der Zellen erhalten.

Im therapeutischen Bereich eröffnen sich durch die Fähigkeit zur Regulation einzelner Gene neue Möglichkeiten. Ansätze zur Behandlung mit siRNA wären dabei Erkrankungen genetischen Ursprungs ergänzend zur Gentherapie, speziell neoplastische, degenerative und metabolische Erkrankungen. Ein weiteres Gebiet der Anwendung wäre die Therapie von RNA-Viruserkrankungen wie HIV und Hepatitisformen durch Unterdrückung der Virussequenzen. Eine Herausforderung für den therapeutischen Einsatz der RNA-Interferenz stellt das Erreichen langfristig stabiler Genunterdrückungen dar. Dabei ist es wichtig, die Unterdrückungseffekte gezielt im erkrankten Gewebe zu erreichen, da eine systemische Herunterregulation von Genen zu zahlreichen Nebenwirkungen führen kann.

2.3.4 Anwendung an Zellen *in vitro*

Zum Einführen der shRNA-Gene in die Zelle können Plasmidvektoren eingesetzt werden. Jedoch ist die Transfektionseffizienz u.a. bei primär neuronalen und hämatopoetischen Zellen nicht ausreichend hoch. Eine alternative, sehr effiziente Methode des Gentransfers basiert auf der Verwendung von Viren als Mediatoren. Die Unterdrückungseffizienz dieser Methode ist höher als unter Verwendung von Plasmidvektoren. Darüberhinaus kommt es zu einer stabilen Unterdrückung des Gens durch Integration der transduzierten Sequenz in das Wirtsgenom. Vier Arten von Viren werden zu diesem Zweck eingesetzt: Retroviren (RV) (einschließlich Lentiviren (LV)), Adenoviren, Adenoassoziierte Viren und Herpes Simplex Viren Typ 1 (*David 1998, Robinson et al. 2003*). Im Folgenden sollen Retroviren und Lentiviren betrachtet werden.

Retro- und Lentiviren sind kapsidumhüllt und besitzen zwei Einzelstrang-RNA-Moleküle von 7-12 kb Länge, die zwei *Long Terminal Repeats* (LTR) beinhalten und deren Gene – *env*, *pol* und *gag* – kodieren (Abbildung 6).



Abbildung 6: Struktur des Genoms von Retro- und Lentivirus

Das Gen *env* kodiert für Oberflächen- und transmembranale Glykoproteine, *pol* für die Reverse Transkriptase und Integrase; *gag* bildet die matrixassoziierten Membranproteine und die Kapsidproteine. Für die retrovirale Infektion müssen die Zielzellen teilungsfähig sein. Lentiviren infizieren sowohl teilungsfähige als auch nicht-teilungsfähige Zellen, da sie auch intakte Kernmembranen passieren können. Daher kommen sie besonders bei Neuronen, Makrophagen, Hämatopoetischen Stammzellen sowie Muskel- und Leberzellen zum Einsatz (*Kumar et al. 2007*).

3 ZIEL DER ARBEIT

Das Neuroblastom ist ein sympathikoadrenaler Tumor der Neuralleiste und tritt vorrangig im Kindesalter auf. Erscheinungsbild sowie Krankheitsverlauf dieses Tumors sind sehr vielfältig, weshalb Parameter eruiert wurden, die eine Risikoeinschätzung für den Patienten ermöglichen. So spricht u.a. eine Amplifikation des Protoonkogens MYCN für einen sehr ungünstigen Krankheitsverlauf. In einer Arbeit von Chesler et al. (*Chesler et al. 2006*) konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass durch Inhibitoren der PI3K das Wachstum von Neuroblastomen aufgehalten wurde. Gleichzeitig kam es zur Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest sowie zur Reduktion der Mycn-Proteinlevel.

Generell erweist sich die Anwendung von PI3Kinase-Inhibitoren sowohl im therapeutischen Bereich als auch für wissenschaftliche Fragestellungen als problematisch. Bislang sind häufig eine Vielzahl von Nebenwirkungen auf zellulärem und organischem Niveau zu beobachten, was ihren Einsatz im medikamentösen Bereich ausschließt. Demzufolge war es bislang nur eingeschränkt möglich, die Funktion einzelner PI3K-Isoformen zu charakterisieren.

Eine alternative und effektive Methode zur Funktionsanalyse von Proteinen eröffnet sich durch das Prinzip der RNA-Interferenz. Sie bietet die Möglichkeit, die Expression einzelner Gene zu inhibieren und somit ihre Funktion zu untersuchen. Das siRNA vermittelte Knockdown ist im Vergleich zum genetischen Knockout eine schnellere und kostengünstigere Methode. Durch die partielle Unterdrückung des Proteinniveaus bei existentiellen Mechanismen bietet sie Vorteile durch die Aufrechterhaltung von biologischen Systemen. An einer Entwicklung der RNA-Interferenz zum therapeutischen Einsatz wird derzeit gearbeitet.

Ziel der Arbeit war es, das Prinzip der RNA-Interferenz zur Unterdrückung der vier Isoformen der Klasse-I-PI3K – α , β , γ und δ – an einer Neuroblastomzelllinie zu nutzen. Dazu sollten lentivirale Partikel hergestellt werden, die pro PI3K-Isoform 4-6 verschiedene nicht-validierte shRNA-Gene beinhalteten. Anschließend sollte deren Transduktion in die Neuroblastomzellen vom Typ SK-N-LO vorgenommen und in einem Screening durch Westernblot und immunologischen Nachweis die Effektivität der Suppressionen überprüft werden. Eine anschließende physiologische Charakterisierung der effektiv supprimierenden Zelllinien sollte speziell die Proliferation durch Ermittlung der Zellzahl und das Apoptoseverhalten im TUNEL-Assay betrachten. Weiterhin sollte eine Untersuchung der Spezifität und Selektivität der Genunterdrückung erfolgen.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Chemikalienliste

Acrylamid	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
β -Mercaptoethanol	Roth
Bacto-Trypton	AppliChem
Bromphenolblau	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA-Laboratories
Butanol	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem
Formaldehyd	Roth
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glycerol	AppliChem
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Serva
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Methanol	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natrium-Desoxycholat	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
NP-40	ICN Biomedicals
Ponceau S	Sigma-Aldrich
RNase A	Roche
Salzsäure (HCl)	Roth

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Promega
Tris	AppliChem
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	PAA-Laboratories
Tween 20	Roth

4.1.2 Bakterien und Plasmide

Von der Firma Sigma-Aldrich wurden Escherichia coli (E.coli) Stämme bezogen, deren pLKO.1-puro-Plasmide die folgenden shRNA-Sequenzen zur Unterdrückung der PI3K α , β , γ und δ sowie eine nontargeting-Kontrolle enthielten (Tabelle 4).

Target	shRNA-Sequenz	Clone-ID (Sigma-Aldrich)	Arbeits- Code
PI3K α	CCGGGATTCCACACTGCACTGTAACTCGAGTTAACAGTGCAGTGTGGAATCTTTTG CCGGCCAGACATCATGTCAGAGTTACTCGAGTAACTCTGACATGATGTCTGGTTTTG CCGGCGAGACATTGACAAGATTTATCTCGAGATAAATCTTGCAATGTCGTTTTG CCGGGCCATCTTATTCCAGACGCATCTCGAGATGCGTCTGGAATAAGATGGCTTTTG CCGGGCTCATTAACTTAAGTACATCTCGAGATGTCAGTTAAGTTAATGAGCTTTTG	NM_006218.1-3251s1c1	α 1
		NM_006218.1-2368s1c1	α 2
		NM_006218.1-1057s1c1	α 3
		NM_006218.1-924s1c1	α 4
		NM_006218.1-2145s1c1	α 5
PI3K β	CCGGCGTGGGTAATACGATGGTTTCTCGAGAAACCATCGTATTTACCCACGTTTTG CCGGCCACTAATTCAGTTCAGTATCTCGAGATACTGGAAGTGAATTAGTGGTTTTG CCGGCCCAATGTTCAACCTCCTTATCTCGAGATAAGGAGGTTGAACATTGGGTTTTG CCGGCGGGGAGAGTAGAATATGTTTCTCGAGAAACATATTCTACTCTCCGCTTTTG	NM_006219.1-1316s1c1	β 1
		NM_006219.1-784s1c1	β 2
		NM_006219.1-198s1c1	β 3
		NM_006219.1-752s1c1	β 4
PI3K γ	CCGGGCAACCTTTGTTCTTGAATACTCGAGTATTCCAAGAACAAGGTTGCTTTTTG CCGGGCAGAGCTTCTTCACCAAGATCTCGAGATCTTGGTGAAGAAGCTCTGCTTTTTG CCGGGCCCTATCAAATGAACAATTCTCGAGAATTGTTTCATTTGATAGGCTTTTTG CCGGCGGGCACATTCTTGGGATTACTCGAGTAATCCCAAGAATGTGCCGTTTTG CCGGCTGTGGAAGAAGATTGCCAACTCGAGTTGGCAATCTTCTCCACAGGTTTTG	NM_002649.2-3122s1c1	γ 1
		NM_002649.2-1045s1c1	γ 2
		NM_002649.2-2774s1c1	γ 3
		NM_002649.2-3205s1c1	γ 4
		NM_002649.2-940s1c1	γ 5
PI3K δ	CCGGCGTGGGCATCATCTTTAAGAACTCGAGTTCTTAAGATGATGCCACGTTTTG CCGGGACCCAGAAGTGAACGACTTCTCGAGAAAGTCGTTCACTTCTGGGCTTTTTG CCGGCGTGATCGAGAAAGCCAAGAACTCGAGTTCTTGGCTTCTCGATCAGTTTTG CCGGGCACAGCGACAACATCATGATCTCGAGATCATGATGTTGTCGCTGTGCTTTTTG	NM_005026.2-2514s1c1	δ 1
		NM_005026.2-592s1c1	δ 2
		NM_005026.2-1383s1c1	δ 3
		NM_005026.2-2877s1c1	δ 4
---	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTTTCATCTTGTGTTTT	lentivirale nontargeting Sequenz	LVcon

Tabelle 4: shRNA-Sequenzen zur Unterdrückung der PI3Kinase-Isoformen

Von der Arbeitsgruppe M. Wymann wurde ein retrovirales Konstrukt zur Unterdrückung der PI3K γ freundlicherweise bereitgestellt.

Desweiteren wurden die lentiviralen Verpackungsplasmide MDL, RSV und VSV der Laborkollektion C. Stocking, HPI Hamburg, zur Virusproduktion verwendet.

4.1.3 Zelllinien

Zelllinie	Art	Eigenschaften	Bezugsquelle
SK-N-LO	humane Neuroblastomzelllinie, adhärent	starke Expression der PI3K α und PI3K γ , weniger starke Expression der PI3K β und PI3K δ	Kinderklinik der FSU Jena
HEK-293T Phoenix-gp	Humane Zelllinie der embryonalen Niere (human embryonal kidney) mit DNA- Anteilen des menschlichen Adenovirus, adhärent	Verpackungszelllinie	C. Stocking, HPI Hamburg

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien

4.1.4 Kulturmedien und Zusätze

Ham's F-12	PAA-Laboratories
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	PAA-Laboratories
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (high glucose)	PAA-Laboratories
Fetales Bovines Serum (FBS), hitzeinaktiviert	Biochrom AG
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences Europe GmbH
Polybrene	Sigma-Aldrich
Puromycin	Sigma-Aldrich

4.1.5 Kits und Hilfsmittel

Plasmid Midi und Maxi Kit	Qiagen
PVDF Immobilon-P Transfer Membrane	Millipore
Prestained Proteinmarker	BioRad
Western Lightning Plus ECL	PerkinElmer Life Science
CL-Xposure Filme	Pierce
Apo-BrdU-Apoptosis Detection Kit	eBioscience

4.1.6 Primäre und sekundäre Antikörper

Zum Nachweis von Proteinen im Rahmen von Westernblots wurden folgende Antikörper eingesetzt (Tabellen 6 und 7).

Primäre Antikörper

Antikörper	Typ	Bezugsquelle	Verdünnung	Molekulargewicht
PI3K α	Kaninchen	Epitomics, Inc.	1:150	110 kDa
PI3K β	Kaninchen	Upstate Biotechnology, Inc.	1:1000	110 kDa
PI3K γ „H1“	Maus	Institut für Molekulare Zellbiologie, Jena	1:100	110 kDa
PI3K δ	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:1000	110 kDa
β -Actin	Maus	Sigma-Aldrich	1:1000	42 kDa
Vinculin	Maus	Sigma-Aldrich	1:1000	124 kDa

Tabelle 6: Primäre Antikörper

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Typ	Kopplung	Bezugsquelle	Verdünnung
Maus-IgG	Ziege polyklonal	HRP	Kirkegaard & Perry Laborat. Gaithersburg	1:10000
Kaninchen-IgG	Ziege polyklonal	HRP	Kirkegaard & Perry Laborat. Gaithersburg	1:10000

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper

4.1.7 Lösungen und Puffer

Bakterienanzucht und Plasmidisolation

LB-Medium	1 % Bacto-Trypton
(pH 7,0)	0,5 % Hefeextrakt
autoklavieren	86 mM NaCl

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl
(pH 7,5)	1 mM EDTA

Zellkultur

1x PBS	4,3 mM Dinatriumhydrogenphosphat
(pH 7,5)	1,4 mM Kaliumdihydrogenphosphat
	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl

Probenerstellung

Lysepuffer	50 mM Tris
(pH 7,4)	1 % NP-40
	0,25 % Natrium-Desoxycholat
	1 mM EDTA
	150 mM NaCl

5x Lämmli-Puffer	10 % SDS
(pH 6,8)	50 % Glycerol
	25 % β -Mercaptoethanol
	0,1 % Bromphenolblau
	300 mM Tris

SDS-Page und Westernblotting

4 x Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris 0,4 % SDS
4 x Laufgelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris 0,4 % SDS
Tris-Glycin-Puffer	0,1 % SDS 25 mM Tris 250 mM Glycin
Transferpuffer	25mM Tris 192mM Glycin 20% Methanol
10x Net-G-Puffer (pH 8,0) → auf 1x verdünnen	1,5 M NaCl 50 mM EDTA 100 mM Tris 0,5 % Tween 20 0,5 % Gelatine
10x TBS-Tween (pH 7,6) → auf 1x verdünnen	0,1M Tris 1M NaCl 1 % Tween 20
TBS-Tween/BSA	1x TBS-Tween 2,5 % BSA
Stripping-Puffer (pH 6,8)	60mM Tris 2% SDS 0,8 % β -Mercaptoethanol

4.2 Methoden

4.2.1 Anzucht von Bakterien

Das Animpfen der *E. coli*-Stämme erfolgte in 50 bzw. 100 ml Kulturen unter sterilen Bedingungen in LB-Medium (Luria Broth-Medium) in Erlenmeyerkolben des 10-fachen Volumens. Ampicillin wurde in der Konzentration 100 µg/ml zugesetzt. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler bei 220 rpm.

Zur Konservierung der Bakterienstämme wurden 500 µl der über Nacht gewachsenen Bakterienkultur im Verhältnis 1:1 in Glycerol aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

4.2.2 Plasmidisolation

Die Plasmidisolation erfolgte entsprechend der Menge der Bakterienkultur unter Verwendung des Plasmid-Midi-Kits (50 ml Kulturvolumen) oder Plasmid Maxi Kits (100 ml Kulturvolumen). Die Arbeitsschritte erfolgten nach vorgegebenem Protokoll des Kits. Dabei wurden zunächst die über Nacht gewachsenen Bakterien durch Zentrifugation von ihrem Medium getrennt, die bakterielle Zellwand lysiert und diese zusammen mit dem verankerten bakteriellen Genom und einem großen Teil der Proteine durch Zentrifugation abgesondert. Im Überstand blieben Proteine, RNA und die Plasmidmoleküle, welche im Folgenden über Anionenaustauschersäulen aus dem geklärten Lysat isoliert, durch Isopropanol gefällt und in TE-Puffer aufgenommen wurden. Eine anschließende Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch Photometrie.

4.2.3 Zellkultur

Die Arbeit mit kultivierten Zellen fand zu jedem Zeitpunkt unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank statt. Bei Bedarf wurden als Kontaminationsschutz Penicillin-Streptomycin und Amphotericin B verwendet.

4.2.3.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden in T-25-Zellkultur-Flaschen mit 5 ml Medium oder in T-75-Zellkultur-Flaschen mit 10 ml Medium kultiviert. Über einen Filter war der Gasaustausch mit der Umgebung gewährleistet. Zur Durchführung von Experimenten wurden die Zellen je nach Bedarf in 6-, 12 oder 24-Well-Platten mit entsprechender Menge Medium ausgesät. Zu den optimalen Wachstumsbedingungen im Inkubator zählten eine Temperatur von 37 °C sowie ein Gehalt an Kohlenstoffdioxid von 5 %.

SK-N-LO-Zellen wuchsen in einem Medium-Gemisch von IMDM und HAM'S F12 im Verhältnis 1:1 unter Zugabe von 10 % FBS. Für die HEK293T-Zellen wurde DMEM-Medium, versetzt mit 10 % FBS, verwendet.

4.2.3.2 Umsetzen von Zellen

Zum Splitten der adhärennten Zellen etwa alle 3-4 Tage wurde zunächst das Medium abgenommen, Trypsin-EDTA oder alternativ PBS-EDTA zugegeben und für max. 5 min inkubiert. Danach wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen, durch Resuspendieren von den Oberflächen gelöst und vereinzelt. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt und frisches Medium zugegeben.

4.2.3.3 Ernten von Zellen

Das Ernten der Zellen zur anschließenden Analyse erfolgte nach Bestimmung der Vitalität und Größe der Zellzahl. Dazu wurden nach Ablösen der adhärennten Zellen 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau versetzt und in einer Neubauerkammer gezählt. Dabei entspricht die Zahl der lebenden Zellen innerhalb der 4x16 Felder einer Kammer multipliziert mit 5000 der Anzahl der Zellen pro ml in der Ausgangszellsuspension. Die Zellen wurde anschließend aus der Flasche entnommen, durch Zentrifugation bei 500 x g (Erdschwerebeschleunigung) für 5 min von ihrem Überstand getrennt und dieser verworfen. Darauf folgte das zweimalige Waschen der Zellpellets mit PBS-Puffer, anschließender Zentrifugation und möglichst vollständigem Entfernen des Waschpuffers. Die Aufbewahrung des Zellpellets erfolgte bei -20°C.

4.2.3.4 Konservierung von Zellen

Zur Konservierung von Zellen wurden diese wie beschrieben von der Oberfläche abgelöst, durch Zentrifugation - 5 min bei 500 x g - vom Medium getrennt und in FBS, versetzt mit 10 % DMSO, resuspendiert. Die Aufbewahrung erfolgte nach langsamer Abkühlung in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff.

Das Auftauen musste zur Schonung der Zellen schnell erfolgen, beispielsweise im Wasserbad bei 37 °C. Sobald ein flüssiger Zustand der Zellsuspension erreicht war, wurde das mit DMSO versetzte FBS nach Zentrifugation für 5 min bei 500 x g abgenommen, die Zellen in Medium resuspendiert und in eine Flasche mit Medium überführt.

4.2.4 Unterdrückung der Genexpression

Zur Unterdrückung der Genexpression in den Zellen wurden die Schritte ‚Produktion von Viruspartikeln‘, ‚Infektion‘ und ‚Selektion‘ durchgeführt (Abbildung 8). Zunächst wurden Viren mithilfe der Verpackungszelllinie HEK293T unter Verwendung der Verpackungsplasmide RSV, VSV und MDL sowie den pLKO.1-puro-Plasmiden produziert. Die Plasmide enthielten u.a. ein shRNA-Gen und ein Puromycin-Resistenz-Gen. Anschließend erfolgte die Infektion der Zielzelllinie mit den Viruspartikeln, welche den Einbau der im Leserahmen befindlichen Sequenzen in das Wirtsgenom zur Folge hatte. Durch die anschließende Selektion gegen Puromycin wurden alle nicht-infizierten Zellen ausgesiekt.

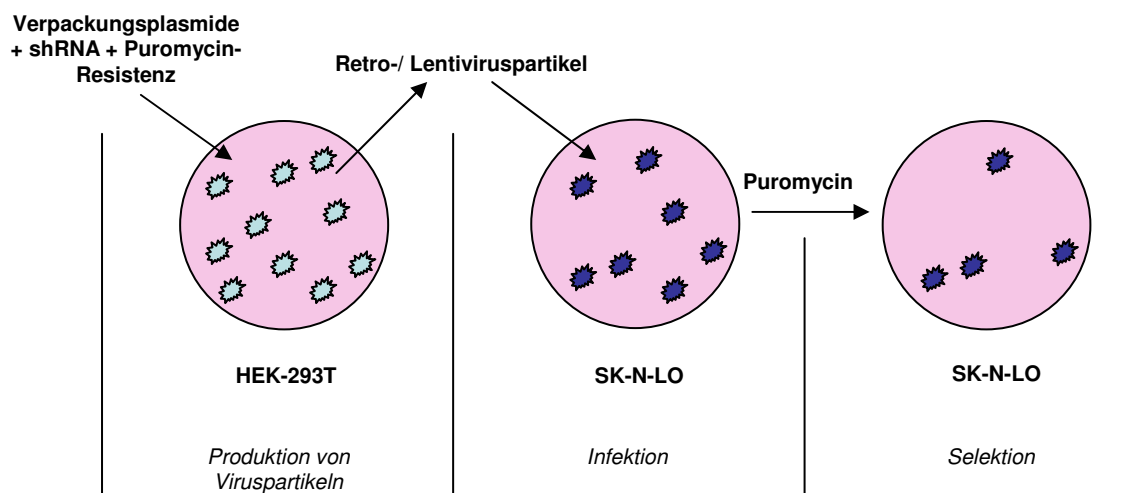


Abbildung 8: Schritte zum Erreichen der Unterdrückung der Genexpression: ‚Produktion von Viruspartikeln‘, ‚Infektion‘ und ‚Selektion‘

4.2.4.1 Produktion von Viruspartikeln

HEK-293T-Zellen wurden mit einer Konfluenz von 30 % in 6-Well-Platten mit 2 ml serumhaltigem DMEM-Medium ausgesät; die Adhärenz der Zellen war nach 8 h festzustellen. Eine Kontrolle zur Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels Transfektion mit dem Grün-Floureszierenden Protein (GFP) wurde mitgeführt.

Für die Virusproduktion wurde das FBS-reiche DMEM-Medium gegen 2 ml DMEM-Medium ohne FBS ausgetauscht und inkubiert. In Eppendorf-Tubes wurden pro Well 250 µl FBS-freies DMEM-Medium mit 2 µg des pLKO.1-Plasmids, 2 µg MDL, 1 µg RSV und 0,4 µg VSV vermischt. Anschließend wurde der DNA PEI (Polyethylenimin) der Konzentration 10 µg/µl, pH 7,2, zugegeben, sodass das Verhältnis PEI zu DNA, welche sich aus shRNA-Plasmiden, MDL, RSV, VSV zusammensetzt, 2,5:1 betrug. Daraufhin erfolgte sofortiges Vermischen der Bestandteile durch Invertieren der Tubes und eine Inkubation für 20-30 min bei Raumtemperatur. Das PEI-DNA-Gemisch wurde vorsichtig auf die vorbereiteten HEK-293T-Zellen verteilt. Nach 4-8 h Inkubation bei 37°C wurde das Medium gegen 2 ml FBS-haltiges DMEM-Medium ausgetauscht. Die Virusernte erfolgte nach weiteren 24 und 48 h durch Gewinnung des Mediums nach Filtration (0,22µm Porengröße) – zur Vermeidung einer Kontamination der Zielzelllinie mit der Verpackungszelllinie – und Auffüllen der Wells mit 2 ml FBS-haltigem Medium. Die so gewonnenen Virusüberstände wurden sofort verwendet oder bei -80°C aufbewahrt.

4.2.4.2 Infektion

SK-N-LO-Zellen einer niedrigen Passagezahl wurden 24 h vor Infektion zu 20.000 Zellen mit 2 ml vollständigem Medium pro Well auf 12-Well-Platten ausgesät und adhärent werden gelassen. Kontrollzelllinien zur Überprüfung der Infektion und der anschließenden Selektion wurden mitgeführt. Die Volumina der kühl gelagerten Virusüberstände (ca. 2 ml) wurden bei 3 Transfektionsvorgängen eingesetzt und so jeweils ca. 600 µl im Abstand von 8-12 h auf die Zellen pipettiert. Der ersten Infektion wurde Polybrene (16µg/ml) zur Herstellung des Kontaktes zwischen Viren und Zelloberfläche zugegeben. 8 h nach der letzten Infektion wurde das Medium aller Ansätze gegen frisches Medium ausgetauscht.

4.2.4.3 Selektion

Zwei Tage nach Abschluss der Infektion wurde mit der Selektion begonnen. Dafür wurde dem Medium über 14 Tage Puromycin (1 µg/ml) zugesetzt; als Referenz diente das Absterben der Zellen in den nichtinfizierten Kontrollansätzen unter Puromycinzusatz. Es konnte davon ausgegangen werden, dass die Zellen, die nach abgeschlossener Selektion weiterhin vital waren, das Puromycin-Resistenzgen aufgenommen hatten und damit in der Lage waren, durch die in das Genom integrierten Sequenzen shRNA zu produzieren.

4.2.5 Proteinnachweis durch SDS und Westernblot

Prinzip dieser Methode ist es, Proteine in einem Gel mit Hilfe eines elektrischen Feldes nach ihren Molekulargewichten aufzutrennen, auf eine Membran zu übertragen und durch spezifische Antikörper und Chemolumineszenzverfahren quantitativ darzustellen.

4.2.5.1 SDS-Page

Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet und als Zellpellets aufbewahrt. Dem auf 0 °C gekühlten Lysepuffer wurden folgende Proteinaseinhibitoren zugesetzt (Tabelle 8).

Proteinaseinhibitor	Konzentration
Aprotinin	1 µg/ml
PMSF	1 mM
Natriumvanadat (zuvor 5 min bei 95°C)	1 mM
Leupeptin	1 µg/ml
Pepstatin A	1 µg/ml

Tabelle 8: Proteinaseinhibitoren

Das Lysieren fand zum Schutz vor Proteinasewirkung auf Eis statt. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse herzustellen, wurde die Zugabe von Lysepuffer den unterschiedlichen Zellzahlen der Zellpellets angeglichen, sodass am Ende in gleichen Mengen Probe gleiche Mengen an Protein enthalten waren. Die in Lysepuffer aufgenommenen, gut resuspendierten Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 15.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der daraufhin von Membranbestandteilen entfernte, proteinenthaltende Überstand wurde abgenommen und mit 5x-Probenpuffer im entsprechenden Verhältnis versetzt. Das Proteingemisch wurde anschließend 8 min bei 95 °C denaturiert.

Das Polyacrylamidgel zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht setzte sich aus einem Trenngel und einem Sammelgel zusammen. Für das 7,5 %ige Trenngel wurden 3,6 ml Acrylamid mit 7,2 ml ddH₂O und 3,6 ml 4 x Laufgelpuffer vermischt und zur Polymerisation mit 32 µl APS und 16 µl TEMED versetzt. Für die Herstellung des 5 %igen Sammelgels wurden zu 0,8 ml Acrylamid 2,8 ml ddH₂O und 1,2 ml 4 x Sammelgelpuffer gegeben und mit 27 µl APS sowie 6 µl TEMED versetzt. Nach Polymerisation der Substanzen in der Apparatur konnten die Proben aufgetragen werden. Der Prestained Proteinmarker wurde zur Orientierung anhand der Molekulargewichte mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 35 mA pro Gel in Tris-Glycin-Puffer.

4.2.5.2 Westernblot

Zur Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf die PVDF-Membran wurde das Tankblot-Verfahren angewandt. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol gewaschen,

Membran und Gel in Transferpuffer equilibriert, die Whatman-Paper in Transferpuffer befeuchtet und luftblasenfrei geschichtet (Abbildung 9).

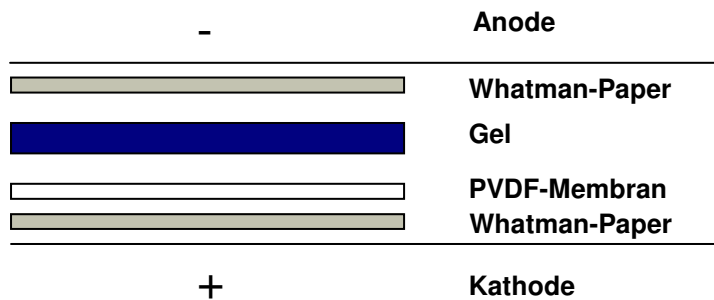


Abbildung 9: Apparaturaufbau im Tankblotverfahren

In eisgekühltem Transferpuffer fand in einem Spannungsfeld von 50 V über 75 min der Übertritt der negativ geladenen Proteine in Richtung Kathode auf die PVDF-Membran statt.

4.2.5.3 Ponceau-Färbung

Zur Überprüfung der Effizienz und Qualität des Blotvorganges wurde eine Ponceau-Färbung vorgenommen, welche unspezifisch und reversibel Proteine auf der ungeblockten PVDF-Membran anfärbt. Durch mehrfaches Waschen in Net-G oder TBS-Tween konnte die Membran wieder entfärbt werden.

4.2.5.4 Immunodetektion

Die Membran wurde für 30 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur in Net-G oder TBS-Tween/BSA geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Der in geeigneter Verdünnung in Net-G oder TBS-Tween/BSA gelöste primäre Antikörper wurde für 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur auf der Membran angewendet. Blocken und Inkubieren des primären Antikörpers konnten alternativ auch über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C durchgeführt werden. Anschließend wurde der primäre Antikörper zur Wiederverwendung rückgewonnen und durch dreimaliges Waschen für je 5-10 min in Net-G oder TBS-Tween der verbleibende ungebundene primäre Antikörper von der Membran gelöst. Zur Bindung an den primären Antikörper wurde der entsprechende, mit HRP-markierte

sekundäre in entsprechender Verdünnung in Net-G oder TBS-Tween/BSA für 30 min auf die Membran gegeben, danach verworfen und ungebundene Bestandteile durch dreimaliges Waschen von der Membran entfernt. Unter Verwendung des Western Lightning Plus ECL-Kits konnte durch Chemolumineszenz eine Visualisierung der markierten Proteine auf CL-Xposure Filmen oder im LAS3000-Gerät stattfinden und eine densitometrische Auswertung durch das Programm Fuji Multi Gauge vorgenommen werden.

4.2.5.5 Strippen der Membranen

Die Membran konnte zum Nachweis von verschiedenen Proteinen mehrfach verwendet werden. Dies war auch nach Aufbewahren der Membran in einer Folie bei -20°C möglich. Vor Wiederverwendung mussten die Antikörper von der Membran gelöst werden, indem diese in Stripping-Puffer 15 min bei 55 °C in einem Wasserbad inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran gründlich gewaschen (3 x 5-10 min in Net-G oder TBS-Tween) und die Immunodetektion ab dem Schritt des Blockens wiederholt.

4.2.6 Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeit wurden die Zelllinien 24 h vor Beginn der Zählung in je 5 Wells einer 12-Well-Platte zu 20.000 Zellen ausgesät und unter oben genannten Bedingungen kultiviert. Ab Tag 1 wurden im Abstand von 24 h über 5 Tage jeweils die Zellzahlen pro Well durch Ernten mit Trypsin-EDTA oder alternativ PBS-EDTA und Zählen in der Neubauerkammer bestimmt (s.o.). Aus den Werten konnten die Verdopplungszeiten wie folgt errechnet und ins Verhältnis zueinander gesetzt werden.

Bestimmung der Verdopplungszeiten:

Als Grundlage diente folgendes Wachstumsgesetz:

$$N(t) = N(t_0) \cdot e^{(t-t_0)/T}$$

$N(t)$...	Zellpopulation zu Zeitpunkt t
$N(t_0)$...	Zellpopulation zu Zeitpunkt t_0
$t-t_0$...	Zeitdifferenz zwischen den Zeitpunkten t und t_0
T ...	Zeitkonstante

Zur Betrachtung der Verdopplungszeit der Zellzahl τ für die Zeitkonstante T ergibt sich durch den Zusammenhang $T = \ln 2 / \tau$ folgende Gleichung:

$$N(t) = N(t_0) \cdot e^{(t-t_0)(\ln 2/\tau)}$$

$N(t)$... Zellpopulation zu Zeitpunkt t
 $N(t_0)$... Zellpopulation zu Zeitpunkt t_0
 $t-t_0$... Zeitdifferenz zwischen den Zeitpunkten t und t_0
 τ ... Verdopplungszeit.

In der Messung wurden die Zellzahlen zu Zeiten (t_1 , t_2) festgestellt. Sie betrugen die Werte $N(t_1)$, $N(t_2)$. Folgende Gleichung ergab sich nach Einsetzen dieser Konstanten aus dem Wachstumsgesetz für die Verdopplungszeit:

$$N(t_2) = N(t_1) \cdot e^{(t_2-t_1)(\ln 2/\tau)}$$

τ ... Verdopplungszeit in h
 t_2-t_1 ... Zeitdifferenz zwischen 2 Messpunkten in h
 $N(t_x)$... Zellzahl zum Zeitpunkt einer Messung;

bzw. nach Umstellung nach τ :

$$\tau = \frac{(t_2-t_1) \cdot \ln 2}{\ln(N(t_2)/N(t_1))}$$

In der Auswertung wurde der Zeitpunkt t_1 (= Tag 1) fixiert und das Wachstum der Zellen über die einzelnen Tage (t_2) (= Tag 2, Tag 3, Tag 4, Tag 5) betrachtet. Speziell wurde das Wachstum vom Anfangszeitpunkt ($N = 20.000$ Zellen) bis zu den verschiedenen nachfolgenden Tagen bestimmt und daraus ein je Wert für die Verdopplungszeit τ errechnet. Aus diesen Werten wurde ein Mittelwert berechnet, welcher die jeweilige Versuchsreihe charakterisiert.

4.2.7 Apoptoseassay

Zur Messung des Apoptoseverhaltens wurde das Apo-BrdU-Apoptosis-Detection-Kit zur Durchführung des TUNEL-Assays (terminal deoxynucleotide transferase dUTP nick end labeling) verwendet (Abbildung 10). Es basiert auf dem Einbau von bromierten Desoxyuridintriphosphat-Nukleotiden (BrdU) an die 3'-Hydroxylenden der DNA fixierter Zellen. Über Markierung von BrdU durch Antikörper und Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-Kopplung lassen sich so freie 3'-Hydroxylenden der DNA durchflusszytometrisch (fluorescence activated cell sorting, FACS) darstellen. Je stärker das FITC-Signal, desto mehr freie Enden lagen aufgrund von verstärktem Einbau bei Doppelstrangbrüchen der DNA vor. Diese gelten als frühes Zeichen der Apoptose und werden durch Aktivierung von Nukleasen

hervorgehoben. Die Durchführung des Versuchs wurde anhand des Protokolls im Kit vorgenommen.

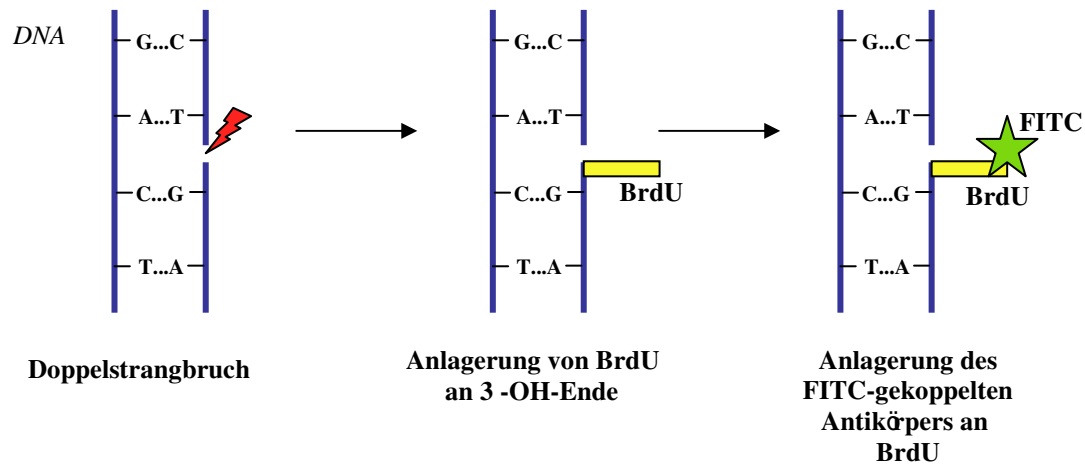


Abbildung 10: Prinzip des TUNEL-Assays zur Messung der Apoptose

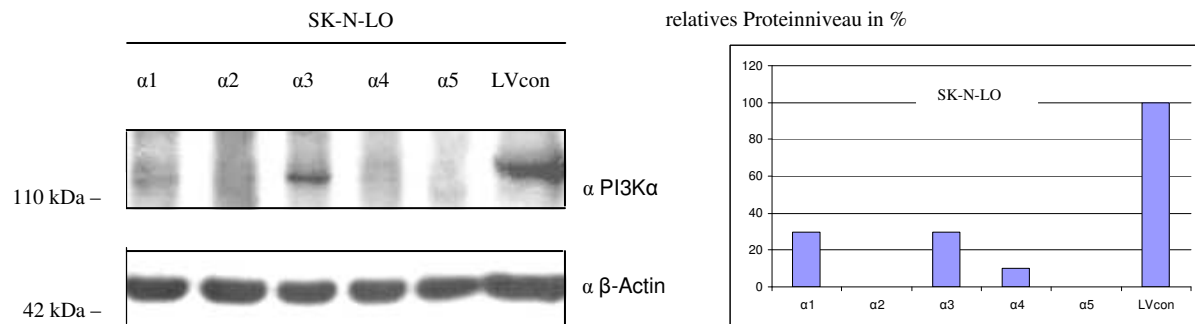
5 ERGEBNISSE

5.1 Lentivirale Erstellung und Charakterisierung von PI3K α -, β -, γ - und δ -inhibierten SK-N-LO-Zellen

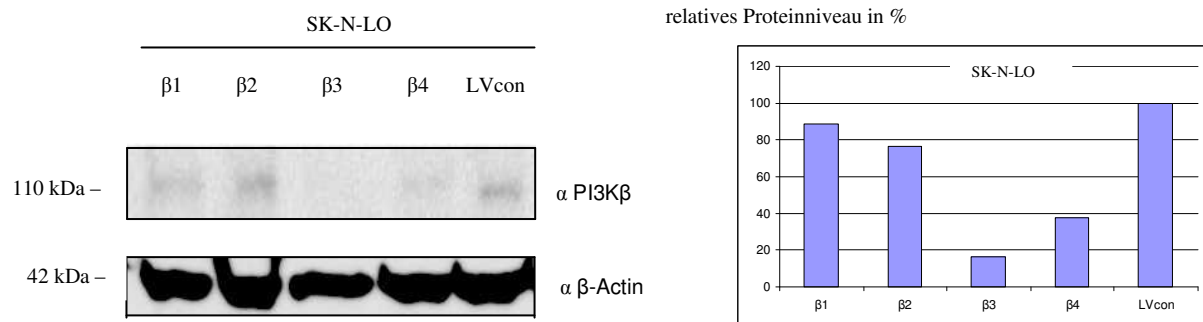
Zunächst sollten die von der Firma Sigma-Aldrich bezogenen shRNA-Gene in SK-N-LO-Zellen stabil exprimiert werden. Im Anschluss sollte die Ermittlung der Effektivität der Unterdrückung der PI3K α , β , γ und δ erfolgen. Es wurden die Verpackungsplasmide sowie die Expressionsvektoren isoliert, welche die shRNA-Gene tragen. Anschließend wurde unter Verwendung der HEK-293T-Zelllinie, der lentiviralen Verpackungsplasmide MDL, RSV und VSV sowie der entsprechenden Plasmide die Produktion von Viruspartikeln vorgenommen. Diese dienten zur Infektion von Zellen der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-LO. Zur Unterdrückung wurden je 5 nicht-validierte shRNA-Gene gegen die Gene der PI3K α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$) und PI3K γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, $\gamma 5$), für die PI3K β und PI3K δ je 4 Gene ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$; $\delta 1$, $\delta 2$, $\delta 3$, $\delta 4$) eingesetzt. Als Referenz wurden SK-N-LO-Zellen lentiviral mit einem *non-targeting*-shRNA-Gen (LVcon) der Firma Sigma-Aldrich parallel transduziert. Nach der Transduktion wurden gegen Puromycin stabile Zelllinien selektiert.

Um die Zelllinien bezüglich der Unterdrückung der PI3K zu charakterisieren, wurde das Niveau der PI3K immunologisch bestimmt. Dazu wurden nach Ernte und Lyse der Zellen ca. 300.000 Zellen pro Spur auf ein 7,5 %iges Acrylamidgel aufgetragen. Das Lysat der *non-targeting* Kontrolle diente als Referenz. Zur Detektion der Proteine (110 kDa) wurden die spezifischen Antikörper gegen PI3K α , PI3K β , PI3K γ und PI3K δ eingesetzt. Mit Hilfe des sekundären Antikörpers sowie des Western Lightning Plus ECL-Kits wurde das Niveau der Proteine mit einem Film oder mittels LAS-3000 visualisiert. Als Ladekontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Molekül β -Actin (42 kDa) gewählt, welches auf derselben Membran mit einem spezifischen Antikörper detektiert wurde. Die folgenden Ergebnisse (Abbildung 11a-d) konnten festgestellt und densitometrisch ausgewertet werden. Das spezifische Expressionsniveau wurde durch Quotientbildung der PI3K gegen β -Actin ermittelt.

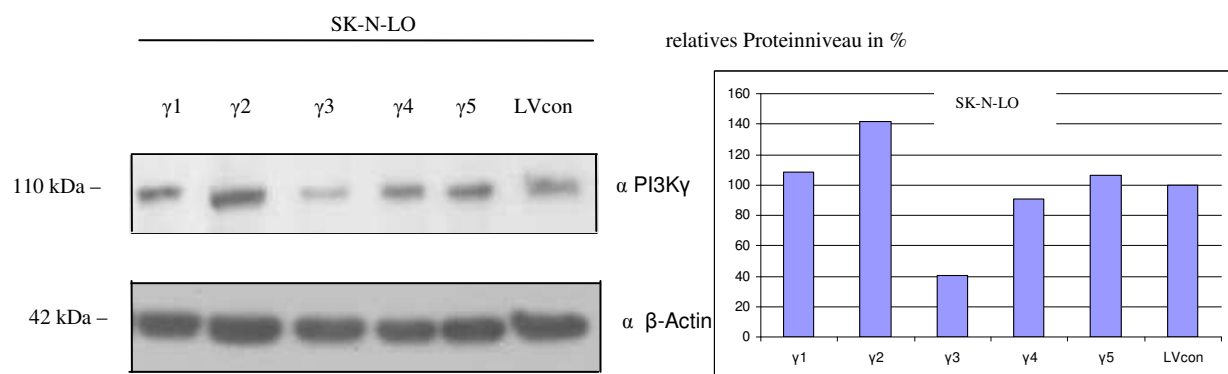
11a) Immunologischer Nachweis und densitometrische Auswertung der Expression der PI3K α



11b) Immunologischer Nachweis und densitometrische Auswertung der Expression der PI3K β



11c) Immunologischer Nachweis und densitometrische Auswertung der Expression der PI3K γ



11d) Immunologischer Nachweis und densitometrische Auswertung der Expression der PI3K δ

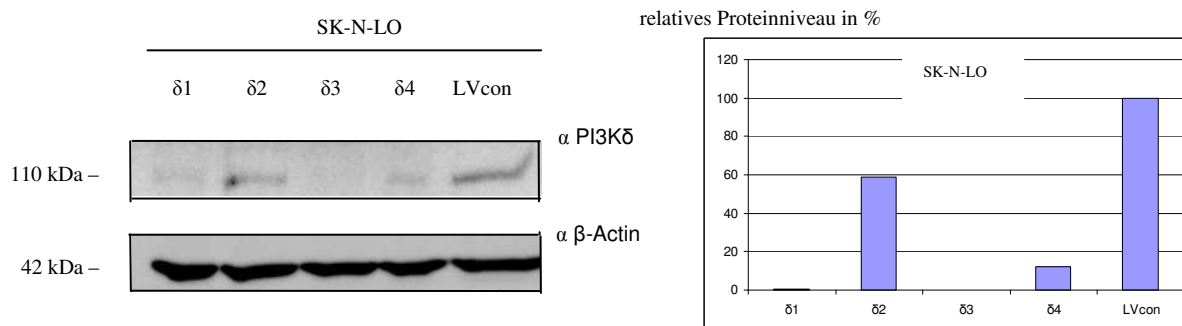


Abbildung 11a-d: shRNA vermittelte Unterdrückung der PI3K α , β , γ und δ in SK-N-LO-Zellen durch lentivirale Transduktion. In Wildtyp-SK-N-LO-Zelllinien wurden lentiviral stabil shRNA-Gene zur Unterdrückung der PI3K α (11a), β (11b), γ (11c) und δ (11d) transduziert. Im Anschluss erfolgte eine Selektion gegen Puromycin. Zum Vergleich wurde eine SK-N-LO-Kontrollzelllinie erstellt, welche lentiviral mit einem *non-targeting* shRNA-Gen transduziert wurde (SK-N-LO-LVcon). Die Zellen wurden geerntet, lysiert und gleiche Proteinmengen über SDS-Page in einem 7,5 %igen Acrylamidgel getrennt. Durch immunologischen Nachweis mittels spezifischer Antikörper wurden die erstellten Zelllinien hinsichtlich der Effizienz der Unterdrückung der PI3K-Genexpression charakterisiert (linke Abbildung). Eine quantitative Auswertung der Chemolumineszenz-Signale fand durch densitometrische Auswertung statt. Die Werte der densitometrischen Auswertung des PI3K-Niveaus wurde ins Verhältnis zum Wert der densitometrischen Auswertung des β -Actin-Niveaus gesetzt (rechte Abbildung).

Beim Vergleich der Expressionsniveaus zeigten die Zelllinien SK-N-LO- α 1-5 eine effiziente Suppressionen der PI3K α -Genexpression im Vergleich zur *non-targeting* Kontrolle SK-N-LO-LVcon. Dabei konnte bei den Zelllinien SK-N-LO- α 2 und SK-N-LO- α 5 eine Expression der PI3K α von <1 % der Kontrollzelllinie festgestellt werden. Auch die Zelllinien SK-N-LO- α 1, SK-N-LO- α 3 und SK-N-LO- α 4 zeigten mit einer PI3K α -Genexpression von unter 30 % deutliche Suppressionen.

Für eine Suppression des Expressionsniveaus der PI3K β erwiesen sich die Zelllinien SK-N-LO- β 3 und SK-N-LO- β 4 als effizient, wobei die Zelllinie SK-N-LO- β 3 eine Unterdrückung auf 16 % der PI3K β -Expression der Kontrollzelllinie LVcon erzielte. Die Zelllinien SK-N-LO- β 1 und SK-N-LO- β 2 reduzierten das Expressionsniveau der PI3K β weniger effektiv um maximal 25 %.

Das Proteinniveau der PI3K γ konnte durch die Zelllinie SK-N-LO- γ 3 auf 40 % der Expression der Kontrollzelllinie gesenkt werden. Die Zelllinie SK-N-LO- γ 4 zeigte eine geringe Expressionsreduktion auf 90 %. Die angestrebte Unterdrückung auf unter 30 % konnte überraschenderweise in keiner der erstellten Zelllinien erreicht werden. Bei der Zelllinie SK-N-LO- γ 2 konnte stattdessen nach der Transduktion der shRNA eine Überexpression der PI3K γ beobachtet werden. In Kontrollexperimenten bestätigten sich die

Zelllinien SN-N-LO- γ 3 und SK-N-LO- γ 4 als Zelllinien der effizientesten Suppression der PI3K γ , jedoch blieb das Expressionsniveau stets über 30 % der Kontrollzelllinie.

Die Analyse der Expressionsniveaus der PI3K δ ergab eine effektive Suppression in allen Zelllinien (SK-N-LO- δ 1-4). Durch die Zelllinien SK-N-LO- δ 1 und SK-N-LO- δ 3 gelang eine Suppression auf < 1 % der Expression der Kontrollzelllinie. Auch die Zelllinie SK-N-LO- δ 4 erzielte eine effektive Suppression des Proteinniveaus auf 12 %, während bei der Zelllinie SK-N-LO- δ 2 die Proteinexpression nur weniger effektiv auf 59 % der Kontrollzelllinie reduziert werden konnte.

Nach Bestätigung dieser Ergebnisse in der Wiederholung des Experimentes wurden eine Auswahl an Zelllinien zur Unterdrückung jeder PI3K mit einer effektiven Unterdrückung der Genexpression (Proteinniveau < 30 % des Ausgangsniveaus angestrebt) zur weiteren phänotypischen Charakterisierung ausgewählt. Dazu zählten die Zelllinien SK-N-LO- α 5, SK-N-LO- β 3, SK-N-LO- γ 3, SK-N-LO- γ 4, SK-N-LO- δ 1 und SK-N-LO- δ 3.

5.2 Retrovirale Erstellung und Charakterisierung einer PI3K γ -inhibierten SK-N-LO-Zelllinie

Parallel zu der lentiviralen Unterdrückung der PI3K wurde eine retroviral vermittelte Unterdrückung der PI3K γ durch shRNA in SK-N-LO-Zellen unter Verwendung eines Konstrukts der Arbeitsgruppe M. Wymann vorgenommen (Zelllinie SK-N-LO- γ RV). Gleichzeitig wurde zur Kontrolle ein retrovirales *non-targeting*-Kontroll-shRNA-Gen in eine SK-N-LO-Zelllinie transduziert (Zelllinie SK-N-LO-RVcon). Die Überprüfung der Effizienz fand durch Westernblot und Immunodetektion dieser beiden Zelllinien und einer SK-N-LO-Zelllinie (Zelllinie SK-N-LO-wt) statt (Abbildung 12). Durch dieses Verfahren konnte eine Reduktion der Expression der PI3K γ in der Zelllinie SK-N-LO- γ RV auf 18 % der Expression in der Kontrollzelllinie SK-N-LO-RVcon erzielt werden. Da die Kontrollen nicht vollkommen gleiche Expressionsniveaus der PI3K γ aufwiesen, wurde der Mittelwert zwischen beiden als 100 %ige PI3K-Expression angenommen.

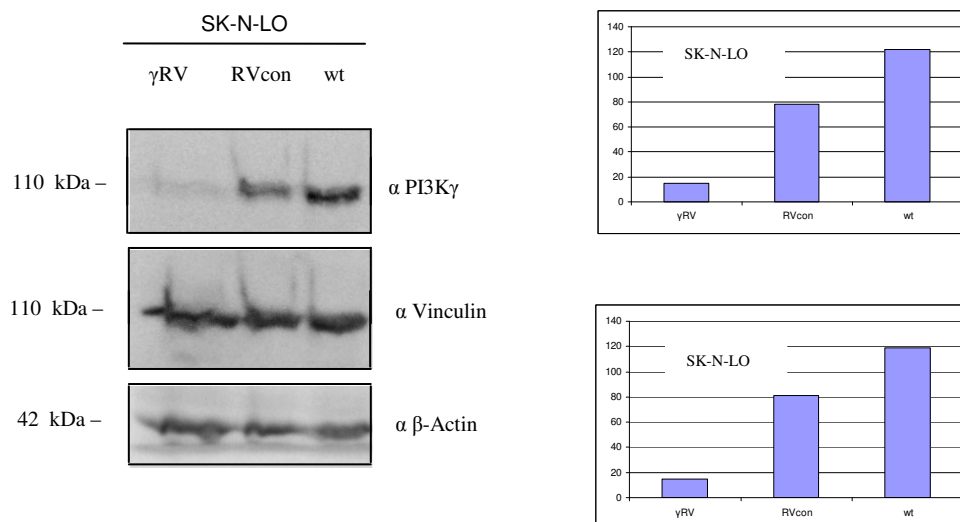
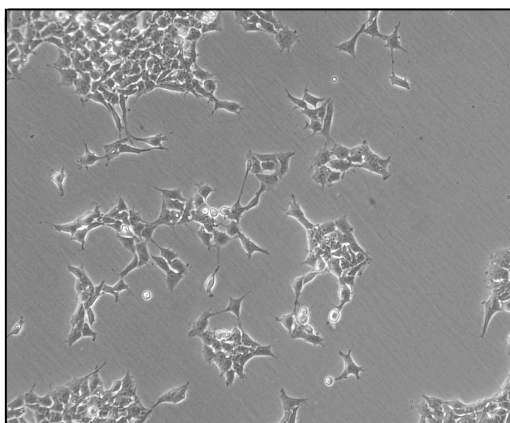


Abbildung 12: shRNA vermittelte Unterdrückung der PI3K γ in SK-N-LO-Zellen durch retrovirale Transduktion. In Wildtyp-SK-N-LO-Zelllinien wurden retroviral stabil ein shRNA-Gen zur Unterdrückung der PI3K γ transduziert. Im Anschluss erfolgte eine Selektion gegen Puromycin. Zum Vergleich wurde eine SK-N-LO-Kontrollzelllinie erstellt, welche retroviral mit einem *non-targeting* shRNA-Gen transduziert wurde (SK-N-LO-RVcon). Die Zellen wurden geerntet, lysiert und gleiche Proteinmengen über SDS-Page in einem 7,5 %igen Acrylamidgel getrennt. Durch immunologischen Nachweis mittels spezifischer Antikörper wurden die erstellten Zelllinien hinsichtlich der Effizienz der Unterdrückung der PI3K-Genexpression charakterisiert (linke Abbildung). Eine quantitative Auswertung der Chemolumineszenz-Signale fand durch densitometrische Auswertung statt. Die Werte der densitometrischen Auswertung des PI3K-Niveaus wurde ins Verhältnis zum Wert der densitometrischen Auswertung des Vinculin (rechte Abbildung oben) bzw. β -Actin-Niveaus (rechte Abbildung unten) gesetzt.

5.3 Charakterisierung phänotypischer Veränderungen der Zelllinie SK-N-LO- β 3 nach shRNA-vermittelter Inhibierung der PI3K β

Nach der Unterdrückung der PI3K β in der Zelllinie SK-N-LO- β 3 konnte eine phänotypische Veränderung dieser Zelllinie im Vergleich zur SK-N-LO-Kontrollzelllinie beobachtet werden (Abbildung 13a/b).

13a) SK-N-LO-Zelllinie mit normalem Phänotyp



13b) Zelllinie SK-N-LO-β3 mit verändertem Phänotyp

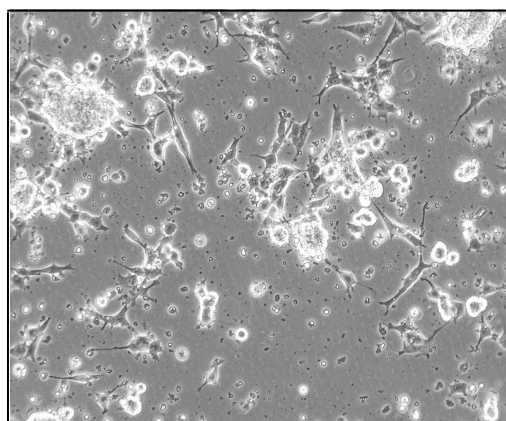


Abbildung 13a/b: Charakterisierung des Phänotyps einer SK-N-LO-Zelllinie im Vergleich zur Zelllinie SK-N-LO-β3. Die linke Abbildung (13a) zeigt die Zelllinie SK-N-LO. Rechts (13b) ist die Zelllinie SK-N-LO-β3 dargestellt, welche eine effiziente Unterdrückung der PI3Kβ aufwies. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einer 12-Well-Platte in entsprechendem Nährmedium unter Normalbedingungen. Das Medium wurde vor der Fotografie zur Erfassung auch apoptotischer Zellen nicht gewechselt.

Das charakteristische planare, gleichmäßige Wachstum der SK-N-LO-Zellen veränderte sich nach Transduktion der shRNA zur Unterdrückung der PI3Kβ in der Zelllinie SK-N-LO-β3. So zeigten sich Unterschiede im Größenverhältnis der Zellen untereinander sowie im Wachstumsverhalten. Auffällig war eine Neigung zu Akkumulationen der Zellen sowie die Aufgabe der streng planaren Ausrichtung. Es zeigte sich vielmehr eine Kumulation in Zellverbänden unter Aufgabe der Adhärenz. Anstelle der vereinzelt, kugeligen apoptotischen Zellen im Überstand bei der Wildtyp-Zelllinie, kam es zum Ablösen ganzer Zellverbände in das Medium bei der Zelllinie SK-N-LO-β3.

5.4 Proliferationsassay und Ermittlung der Verdopplungszeiten von retro- und lentiviral transduzierten SK-N-LO-Zelllinien nach Inhibierung der PI3Kα, β, γ und δ

Um zu beurteilen, ob die Unterdrückung der PI3K einen Einfluss auf Wachstums- und Teilungseigenschaften der Zellen hatte, wurden Proliferationsassays angefertigt. Dazu wurden je 20.000 Zellen in 5 Wells einer 12-Well-Platte pro Zelllinie ausgesät und die Zellzahlen über 3-5 Tage bestimmt. Beim Messen der Zellzahlen wurden durch Trypanblau-Färbung apoptotische Zellen markiert und in der Zählung nicht berücksichtigt. Aus den gemessenen Werten wurden anschließend die Verdopplungszeiten der Zelllinien berechnet und im Verhältnis zur Kontrollzelllinie aufgetragen.

5.4.1 Proliferation der lentiviral transduzierten SK-N-LO-Zelllinien

Um die Proliferation zu untersuchen wurden die Proliferationszeiten der lentiviral transduzierten *non-targeting*-Kontrollzelllinie SK-N-LO-LVcon und der Kontrollzelllinie SK-N-LO-wt über 5 Tage ermittelt. Beide Zelllinien zeigten ähnliche Proliferationsgeschwindigkeiten (Abbildung 14). Die errechneten Verdopplungszeiten betrugen 27 h für SK-N-LO-wt und 33 h für SK-N-LO-LVcon. Daraus ergibt sich ein vergleichbares Proliferationsverhalten der Kontrollzelllinien.

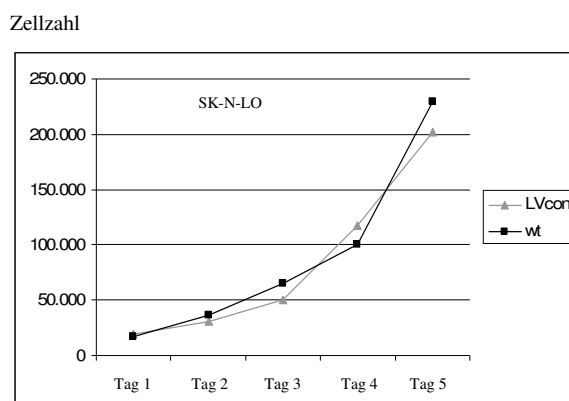
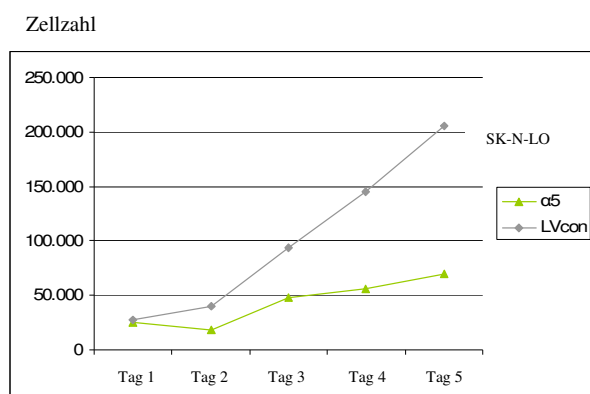
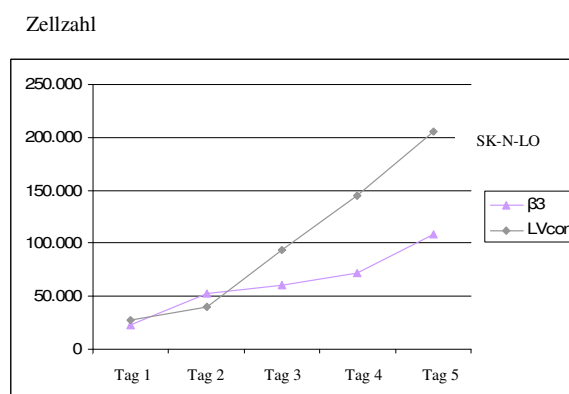
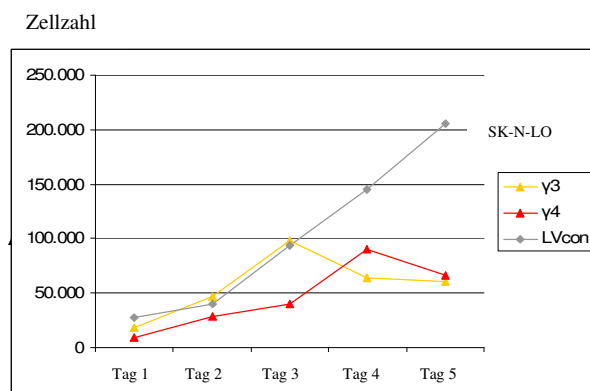
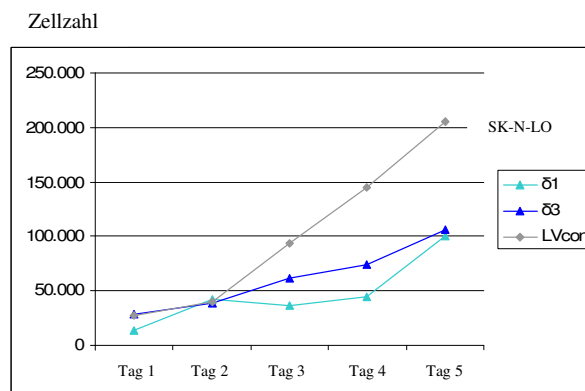


Abbildung 14: Proliferation der Zelllinien SK-N-LO und der lentiviral transduzierten *non-targeting* Kontrolle SK-N-LO-LVcon im Vergleich. Die Zelllinien wurden zu 20.000 Zellen in je 5 Wells einer 12-Well-Platte ausgesät und in 2 ml Medium, versetzt mit FBS, kultiviert. Über 5 Tage wurde jeden Tag die Zellzahl eines Wells bestimmt, was Aussagen über die Proliferation der Zellen ermöglichte.

Es erfolgte weiterhin die Messung der Proliferation der lentiviral transduzierten Zelllinien SK-N-LO- α 5, SK-N-LO- β 3, SK-N-LO- γ 3, SK-N-LO- γ 4, SK-N-LO- δ 1 und SK-N-LO- δ 3. Das Experiment wurde über 5 Tage geführt und als Kontrolle die Zelllinie SK-N-LO-LVcon eingesetzt (Abbildung 15a-d).

15a) Proliferation der Zelllinie SK-N-LO- $\alpha 5$ **15b) Proliferation der Zelllinie SK-N-LO- $\beta 3$** **15c) Proliferation der Zelllinien SK-N-LO- $\gamma 3$ und SK-N-LO- $\gamma 4$** **15 d) Proliferation der Zelllinien SK-N-LO- $\delta 1$ und SK-N-LO- $\delta 3$** 

Abbildungen 15a-d: Proliferation der lentiviral transduzierten Zelllinien. Es wurden die Zelllinien SK-N-LO- $\alpha 5$ (Unterdrückung der Expression der PI3K α , **15a**), SK-N-LO- $\beta 3$ (Unterdrückung Expression der PI3K β , **15b**), SK-N-LO- $\gamma 3$ und SK-N-LO- $\gamma 4$ (Unterdrückung der Expression der PI3K γ , **15c**) sowie SK-N-LO- $\delta 1$ und SK-N-LO- $\delta 3$ (Unterdrückung der Expression der PI3K δ , **15d**). Die Zelllinien wurden zu 20.000 Zellen in je 5 Wells einer 12-Well-Platte ausgesät und in 2 ml Medium, versetzt mit FBS, kultiviert. Über 5 Tage wurde täglich die gesamte Zellzahl eines Wells bestimmt.

Es zeigte sich eine deutlich reduzierte Proliferation der Zelllinien mit inhibierten PI3K α , PI3K β , PI3K γ und PI3K δ im Vergleich zur Kontrollzelllinie. Zur Veranschaulichung der Wachstumsinhibition wurden die Verdopplungszeiten anhand errechneter Verdopplungszeiten in Bezug zur Kontrollzelllinie gesetzt. Die stärksten Effekte waren bei den Zelllinien SK-N-LO- $\alpha 5$ mit 53 %, SK-N-LO- $\gamma 3$ mit 69 %, SK-N-LO- $\gamma 4$ mit 53 % und SK-N-LO- $\delta 1$ mit 54 % der Proliferation der Kontrollzelllinie zu beobachten. Durch Ergebnisse in der Wiederholung des Experimentes zeigte sich jedoch ein erheblicher Schwankungsbereich dieser Werte (siehe Abbildung 16). Gut reproduzierbare Ergebnisse konnten bei der Proliferation der Zelllinien

SK-N-LO- β 3 (78 %) und SK-N-LO- δ 3 (76 %) sowie der Kontrollzelllinie LVcon festgestellt werden.

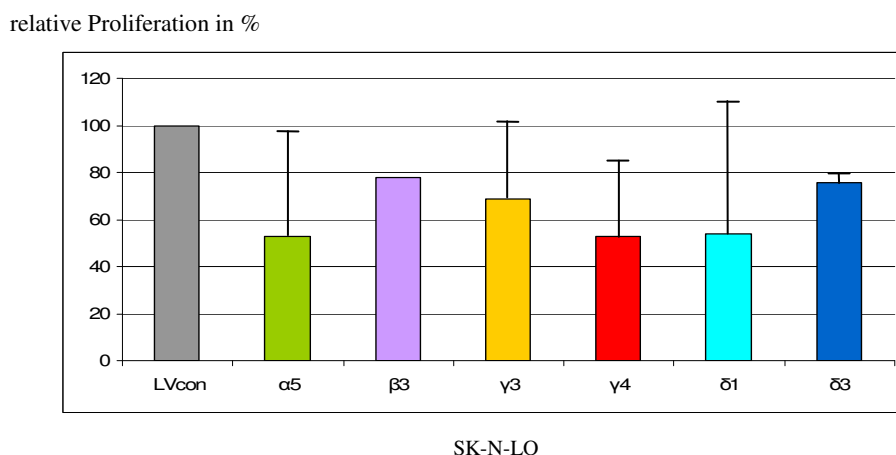


Abbildung 16: Relation der Proliferationsgeschwindigkeiten der lentiviral transduzierten Zelllinien SK-N-LO- α 5, SK-N-LO- β 3, SK-N-LO- γ 3, SK-N-LO- γ 4, SK-N-LO- δ 1 und SK-N-LO- δ 3 zur *non-targeting* transduzierten Zelllinie SK-N-LO-LVcon. Aus den Proliferationsdaten wurden die Verdopplungszeiten errechnet und im Verhältnis zur Verdopplungszeit der Kontrolle dargestellt. Für die Kontrolle LVcon wurde das Wachstum als 100 % definiert. Eine Wiederholung des Experimentes wurde zur Darstellung des Schwankungsbereiches ausgewertet und in die Darstellung mit einbezogen.

5.4.2 Proliferation der retroviral transduzierten Zelllinie

In einem weiteren Experiment wurde die Proliferation der retroviral transduzierten, PI3K γ -supprimierenden Zelllinien SK-N-LO- γ RV im Vergleich zu der *non-targeting*-Kontrollzelllinie SK-N-LO-RVcon über 3 Tage untersucht (Abbildung 17).

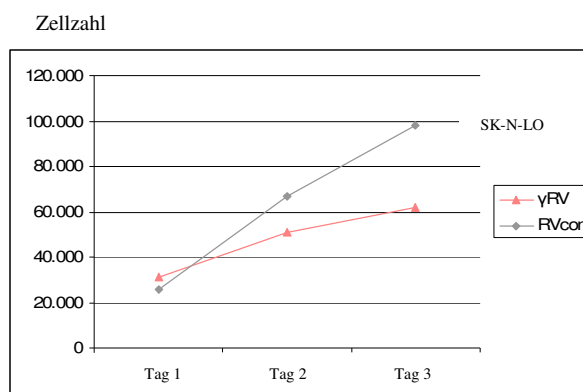
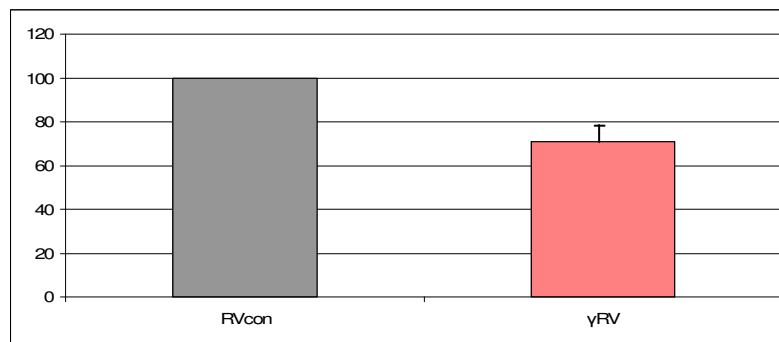


Abbildung 17: Proliferation der retroviral transduzierten, PI3K γ unterdrückenden Zelllinien SK-N-LO- γ RV und SK-N-LO-RVcon. Die Zelllinien wurden zu 20.000 Zellen in je 3 Wells einer 12-Well-Platte ausgesät und in 2 ml Medium, versetzt mit FBS, kultiviert. Über 3 Tage wurde jeden Tag die Zellzahl eines Wells bestimmt.

Die Zelllinie SK-N-LO- γ RV zeigte ein deutlich verlangsamtes Wachstum gegenüber ihrer Kontrolle. Durch die Berechnung der Verdopplungszeiten ließ sich die Relation zur Kontrollzelllinie herstellen und ergab eine Reduktion der Proliferation auf 71 % (Abbildung 18). Eine Wiederholung des Experimentes bestätigte die Ergebnisse und wurde in der Abbildung berücksichtigt.



SK-N-LO

Abbildung 18: Relation der Proliferationsgeschwindigkeiten der retroviral transduzierten Zelllinie SK-N-LO- γ RV zur non-targeting transduzierten Zelllinie SK-N-LO-RVcon. Aus den Proliferationsdaten wurden die Verdopplungszeiten errechnet und im Verhältnis zur Verdopplungszeit der Kontrolle dargestellt. Für die Kontrolle RVcon wurde das Wachstum als 100 % definiert. Eine Wiederholung des Experimentes wurde zur Darstellung des Schwankungsbereiches ausgewertet und in die Darstellung mit einbezogen.

5.5 Apoptoseverhalten der lentiviral transduzierten SK-N-LO-Zelllinien nach Inhibierung der PI3K α , β , γ und δ

Zur weiteren Charakterisierung der erstellten Zelllinien wurde untersucht, in wie weit die Unterdrückung der einzelnen PI3K-Isoformen zu einer Induktion von Apoptose führte. Dazu wurde ein TUNEL-Assay unter Verwendung des Apo-BrdU-Apoptosis Detection Kits durchgeführt und die Zellen anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Prinzip dieser Methode ist der Einbau von bromierten Desoxyuridintriphosphat-Nukleotiden (BrdU) an freie 3'-Hydroxylenden der DNA. Da bei apoptotischen Zellen durch induzierte Doppelstrangbrüche vermehrt freie 3'-Hydroxylenden vorliegen, kommt es zu vermehrtem Einbau von BrdU. Durch Bindung von Antikörpern und Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) kann durchflusszytometrisch die Signalstärke von FITC gemessen werden. 24 h vor Beginn des Experiments wurden die Zellen gehungert, indem das FCS-haltige Medium gegen Medium ohne Zusatz von FBS ausgetauscht wurde.

Es wurden die lentiviral transduzierten Zelllinien SK-N-LO- α 5, SK-N-LO- β 3, SK-N-LO- γ 3, SK-N-LO- γ 4, SK-N-LO- δ 1 und SK-N-LO- δ 3 analysiert. Da die retroviral transduzierten

Zelllinien (SK-N-LO- γ RV und SK-N-LO-RVcon) an GFP (grün-floureszierendes Protein) gekoppelt waren, emittierten sie nach Anregung grünes Licht. Eine Messung des ebenfalls grünen FITC-Signals im TUNEL-Assay wäre nicht möglich gewesen. In einer SK-N-LO-Kontrollzelllinie wurde dem Medium 10 % FBS zugesetzt. Als weitere Kontrollen wurden gehungerte SK-N-LO-Zellen, gehungerte SK-N-LO-LVcon-Zellen und gehungerte, zur Induktion der Apoptose für 150 min mit 1 μ mol STS (Staurosporin) behandelte SK-N-LO-Zellen eingesetzt.

Die Behandlung der Zellen erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Zur Auswertung der Ergebnisse in der FACS-Untersuchung erfolgte die Definition der Zellpopulation aus dem FSC(forward-scatter)-SSC(side-scatter)-Blot unter Betrachtung der Negativkontrolle (nicht-gehungerte wt-SK-N-LO-Zelllinie, Abbildung 19a).

19a) Definition der Zellpopulation

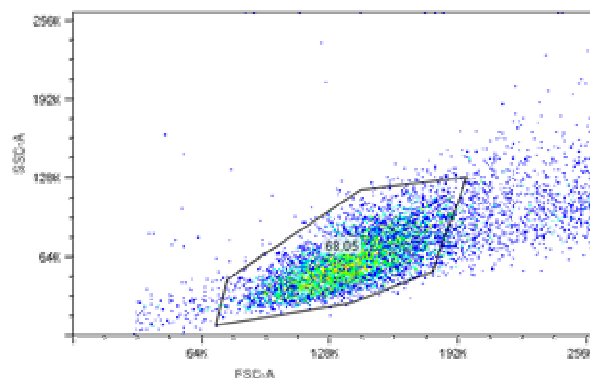
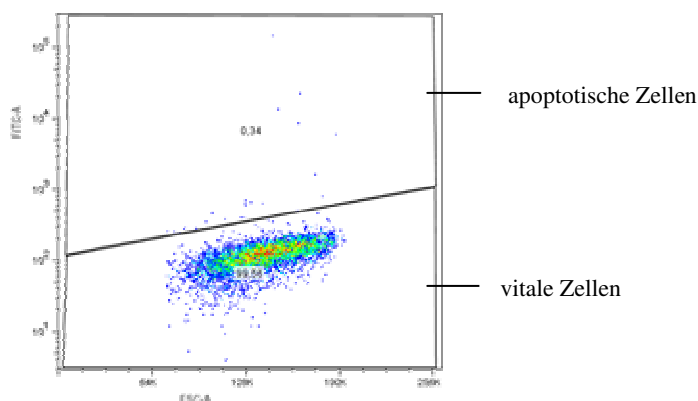


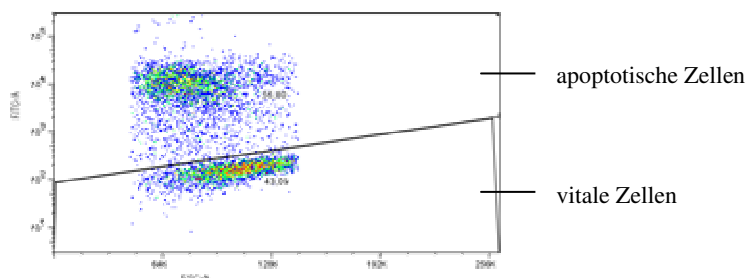
Abbildung 19a: Durchflusssytometrische Darstellung von SK-N-LO Zellen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in FBS-haltigem zellspezifischen Medium. Die Zellen wurden nach Anleitung des Apo-BrdU-Apoptosis Detection Kits behandelt und anschließend durchflusssytometrisch analysiert. Die Definition der Zellpopulation erfolgte anhand der Größe im FSC und SSC.

Zur Unterscheidung der vitalen von apoptotischen Zellen wurde das FITC-Signal gemessen. Deutlich erhöhte FITC-Signale deuteten dabei auf eine erhöhte Anzahl an Doppelstrangbrüchen hin, was ein Hinweis auf das Vorliegen apoptotischer Zellen ist. Abbildung 19b stellt das Verhältnis vitaler zu apoptotischen Zellen der Kontrollzelllinie SK-N-LO, kultiviert in Medium mit Zugabe von FBS, dar (Negativkontrolle). In Abbildung 19c ist die Apoptosemessung der SK-N-LO-Zelllinie unter Zugabe von 1 μ mol STS und Kultivierung in serumfreiem Medium gezeigt (Positivkontrolle). Abbildung 19d stellt die Apoptosemessung der Zelllinie SK-N-LO- α 5 nach Kultivierung in serumfreiem Medium dar. Die Ergebnisse aller weiteren Apoptosemessungen zur Charakterisierung der transduzierten Zellen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

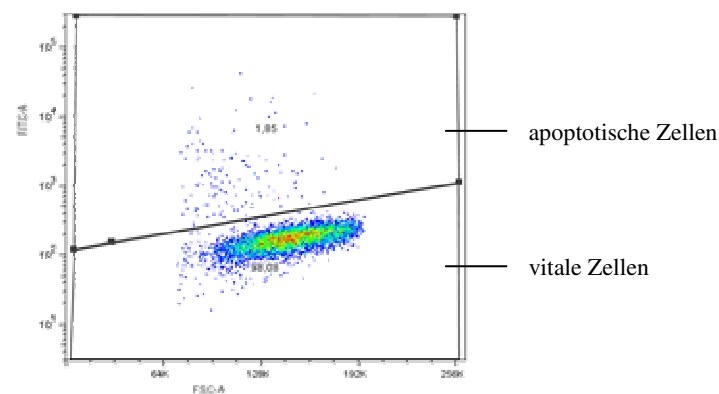
19b) Verhältnis vitaler zu apoptotischen Zellen bei der Zelllinie SK-N-LO nach Kultivierung in Medium mit Zusatz von FBS



19c) Verhältnis vitaler zu apoptotischen Zellen bei der Zelllinie SK-N-LO nach Zugabe von STS und nach Kultivierung in serumfreiem Medium



19d) Verhältnis vitaler zu apoptotischen Zellen bei der Zelllinie SK-N-LO-α5 nach Kultivierung in serumfreiem Medium



Abbildungen 19b-d: Analyse der Apoptoserate verschiedener Zelllinien. Messung der Apoptoserate der Zelllinie SK-N-LO nach Kultivierung in Medium, versetzt mit 10 % FBS (**19b**), der Zelllinie SK-N-LO nach Zugabe von 1 μmol STS und nach Kultivierung in serumfreiem Medium (**19c**) sowie der Zelllinie SK-N-LO- $\alpha 5$ nach Kultivierung in serumfreiem Medium (**19d**). Die Definition der Zellpopulation aus Abbildung 19a wurde für die Auswertung dieser Zellpopulationen übernommen. Die Unterteilung nach vitalen und apoptotischen Zellpopulationen wurde anhand der FITC-Signalstärke getroffen und gegen den FSC aufgetragen. Die Stärke des FITC-Signals verhält sich proportional zur Anzahl von Doppelstrangbrüchen und ist damit ein Indikator apoptotischer Zellen.

Zelllinie	Vitale Zellen	Apoptotische Zellen
SK-N-LO- α 5	98,08 %	1,85 %
SK-N-LO- β 3	99,44 %	0,45 %
SK-N-LO- γ 3	99,13 %	0,36 %
SK-N-LO- γ 4	99,42 %	0,38 %
SK-N-LO- δ 1	98,99 %	0,85 %
SK-N-LO- δ 3	99,45 %	0,37 %
SK-N-LO-LVcon	99,56 %	0,34 %

Tabelle 9: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der lentiviral transduzierten Zelllinien. Die Zelllinien SK-N-LO- α 5, SK-N-LO- β 3, SK-N-LO- γ 3, SK-N-LO- γ 4, SK-N-LO- δ 1, SK-N-LO- δ 3 und die *non-targeting*-Kontrollzelllinie SK-N-LO-LVcon wurden nach Kultivieren in serumfreiem Medium auf ihre FITC-Signalstärke gegen den FSC untersucht. Die Definition der Zellpopulation aus Abbildung 19a wurde für die Auswertung dieser Zellpopulationen übernommen. Die Tabelle zeigt zusammenfassend eine Übersicht über das prozentuale Verhältnis von vitalen zu apoptotischen Zellen in den Zellpopulationen.

Die Apoptoserate der Negativkontrolle betrug 0,34 %. Bei der Positivkontrolle befanden sich 56,80 % der Zellen in Apoptose. Damit wurde gezeigt, dass eine STS-vermittelte induzierte Apoptose nachgewiesen werden konnte und das Experiment für eine Apoptosemessung geeignet war.

Ein Anstieg der Apoptoserate von >5 % im Vergleich zur Negativkontrolle war bei keiner der lentiviral transduzierten, PI3K-unterdrückenden Zelllinien festzustellen. Ein verändertes Apoptoseverhalten der transduzierten Zelllinien konnte damit nicht festgestellt werden. Die Apoptoserate der *non-targeting* transduzierten Kontrolle SK-N-LO-LVcon entsprach etwa den Werten der Negativkontrolle. Die höchste Steigerung der Apoptoserate nach Kultivieren der Zellen in FBS-freiem Medium erreichte die Zelllinie SK-N-KO- α 5 (Unterdrückung der PI3K α) mit 1,85 %.

5.6 Untersuchung von Spezifität und Stabilität der lentiviral-vermittelten Inhibierungen der PI3K α , β , γ und δ in SK-N-LO-Zellen nach mehreren Passagen

Weiterhin wurde untersucht, in wie weit die Unterdrückungen nach einigen Passagen noch spezifisch für die Ziel-PI3K-Isoform waren, was gleichzeitig Aussagen zur Stabilität der Unterdrückungen ermöglichte. Dazu wurden in einem Experiment die 6 lentiviral hergestellten SK-N-LO-Zelllinien mit der effizientesten Unterdrückung (α 5, β 3, γ 3, γ 4, δ 1, δ 3) geerntet, lysiert und durch Auftragen auf einem Gel in Westernblot und Immunodetektion durch spezifische Antikörper die Proteinlevel der einzelnen PI3K-Isoformen nachgewiesen.

Durch Strippen konnten nacheinander verschiedene Proteine dargestellt werden. Als Ladekontrollen dienten die immunologischen Nachweise von β -Actin und Vinculin durch die jeweiligen spezifischen Antikörper. Folgende Ergebnisse bezüglich Spezifität und Stabilität konnten festgestellt werden (Abbildung 20):

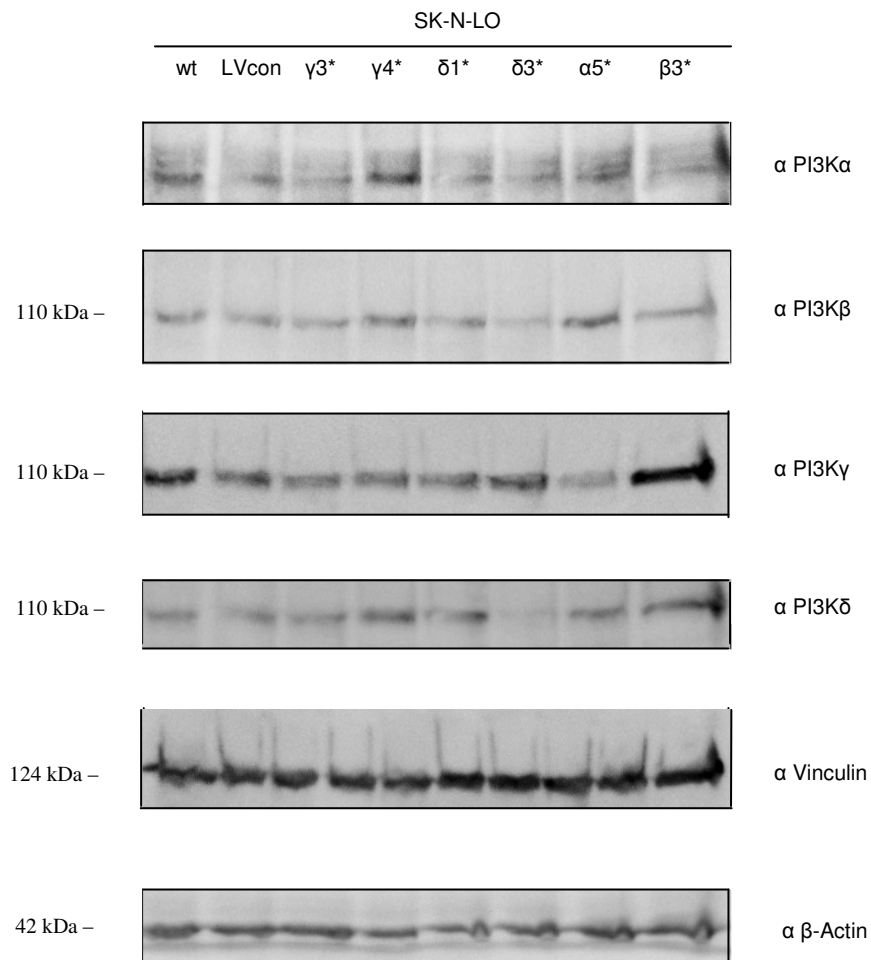


Abbildung 20: Charakterisierung der zuvor lentiviral erstellten Zelllinien hinsichtlich Stabilität und Spezifität der Unterdrückung des PI3K-Expressionsniveaus. Durch das veränderte Unterdrückungsverhalten im Vergleich zu den Ausgangszelllinien wurden die hier aufgeführten Zelllinien mit einem * markiert. Die Zelllinien SK-N-LO, SK-N-LO-LVcon, SK-N-LO- $\gamma 3^*$, SK-N-LO- $\gamma 4^*$, SK-N-LO- $\delta 1^*$, SK-N-LO- $\delta 3^*$, SK-N-LO- $\alpha 5^*$ und SK-N-LO- $\beta 3^*$ wurden nach Kultivierung über ca. 5 Passagen geerntet, lysiert und gleiche Proteinmengen über SDS-Page in einem 7,5 %igen Acrylamidgel getrennt. Durch immunologischen Nachweis mittels spezifischer Antikörper wurden die Zelllinien hinsichtlich Spezifität und Stabilität der zuvor bestätigten Unterdrückungen der PI3K-Genexpression charakterisiert. Als Ladekontrolle dienten die Nachweise der konstitutiv exprimierten Proteine Vinculin und β -Actin auf der Membran.

Das Experiment zeigt, dass bei Untersuchungen nach ca. 5 Passagen ein verändertes Expressionsniveau der PI3K vorlag. Zuvor waren die Zelllinien wiederholt als effektiv in ihrer Unterdrückung nach der Transduktion charakterisiert worden. Als stabil erwies sich die

Unterdrückung der PI3K δ in der Zelllinie SK-N-LO- δ 3*. In allen anderen Zelllinien kam es zu Angleichungen an das Expressionsniveau der Kontrollen. Die Zelllinie SK-N-LO- γ 4* zeigte eine Überexpression der PI3K α . Bei der Zelllinie SK-N-LO- β 3* kam es zu einer deutlichen Überexpression der PI3K γ . Die Zelllinie SK-N-LO- α 5* zeigte eine reduzierte Expression der PI3K γ . Wiederholungen bestätigten die Beobachtungen.

6 DISKUSSION

Für die Vermittlung onkogener Signale sind neben verschiedenen anderen Signalmolekülen die PI3K als bedeutsam charakterisiert worden. Das Auftreten von Tumoren nach Suppression des PI3K-Antagonisten PTEN weist darauf hin, dass PI3K bei der Regulation onkogener Prozesse eine Rolle spielen. PI3K stellen eine Gruppe von Lipid- und Proteinkinasen dar, welche nach rezeptorvermittelter Aktivierung, u.a. durch Wachstumsfaktoren und Insulin, in einer ihrer wesentlichen Funktionen $PI(4,5)P_2$ zu $PI(3,4,5)P_3$ phosphoryliert. $PI(3,4,5)P_3$ bewirkt u.a. über die Phosphorylierung von Akt sowie nachgeschalteter Proteine eine Vielzahl von Effekten (siehe Kapitel 2.2.3). PI3K kontrollieren basale Zellfunktionen wie Zellwachstum, Zellteilung, Apoptoseverhalten, Immortalisierung, Angiogenese und Invasion. Eine Fehlregulation kann bei zahlreichen neoplastischen Prozessen eine Rolle spielen. So können im Neuroblastom, einem bedeutenden Tumor des Kindesalters, alle PI3K der Klasse I ($PI3K\alpha$, $PI3K\beta$, $PI3K\gamma$ und $PI3K\delta$) exprimiert sein. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Bedeutung dieser Enzyme im Neuroblastom. Ziel der Arbeit war es, die PI3K in der Neuroblastomzelllinie SK-N-LO nach lentivirusvermittelter Transduktion von shRNA-Genen spezifisch zu unterdrücken und anschließend das Proliferations- und Apoptoseverhalten der PI3K-inhibierten Zelllinien zu analysieren.

6.1 Unterdrückung der PI3K

Zur Unterdrückung der PI3K wurden shRNA kodierende Gene sowie ein Puromycin-Resistenzgen unter Verwendung von retro- und lentiviralen Partikeln stabil in die Neuroblastomzelllinie SK-N-LO transduziert. Nach einer Selektion gegen Puromycin wurden die resistenten, erfolgreich transduzierten Zellen kultiviert.

Durch Westernblot und Immunodetektion konnten Unterdrückungen durch lentivirale Transduktion auf < 1 % der Wildtyp-Expression der $PI3K\alpha$ (Zelllinie SK-N-LO- $\alpha 5$); 16 % der $PI3K\beta$ (Zelllinie SK-N-LO- $\beta 3$); 40 % (Zelllinie SK-N-LO- $\gamma 3$) und 90 % (Zelllinie SK-N-LO- $\gamma 4$) der $PI3K\gamma$ sowie <1 % (Zelllinien SK-N-LO- $\delta 3$ und SK-N-LO- $\delta 1$) der $PI3K\delta$ erreicht werden. Ein retroviraler Ansatz zur Unterdrückung der $PI3K\gamma$ reduzierte die Expression des Enzyms auf 18 %. Die Ergebnisse waren reproduzierbar, was ein Indiz für eine stabile Unterdrückung der Genexpression ist.

Bei analogen Untersuchungen durch Westernblot und Immunodetektion, die zu späteren Zeitpunkten (nach ca. 5 Passagen) durchgeführt wurden, war nur noch in der Zelllinie SK-N-LO- $\delta 3^*$ eine stabile Unterdrückung der PI3K δ nachweisbar. In allen anderen retroviral transduzierten Zelllinien waren die Unterdrückungen instabil. In einigen Zelllinien konnten Überexpressionen festgestellt werden, so in der Zelllinie SK-N-LO- $\gamma 4^*$ (Überexpression der PI3K α) sowie in der Zelllinie SK-N-LO- $\beta 3^*$ (Überexpression der PI3K γ). In der Zelllinie SK-N-LO- $\alpha 5^*$ konnte eine reduzierte Expression der PI3K γ beobachtet werden.

Zum Ausschluss einer Kontamination mit nicht-transduzierten, schneller proliferierenden Zellpopulationen in den Flaschen der transduzierten Zellen wurde eine erneute Selektion gegen Puromycin über 14 Tage vorgenommen. Dabei konnten keine erhöhten Mengen an nachselektierten Zellen im Überstand festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich nach wie vor um eine homogen transduzierte Zellpopulation handelte, die, gekoppelt an das Puromycin-Resistenzgen, das transduzierte shRNA-Gen exprimierten. Da sich die ebenfalls transduzierten *non-targeting* Kontrollen (LVcon, RVcon) in ihren Eigenschaften unverändert und etwa wie die nicht-transduzierte SK-N-LO-Zelllinie verhielten, sind diese Beobachtungen am wahrscheinlichsten durch endogene Effekte als Reaktion auf die Unterdrückungen in den transduzierten Zellen zu erklären.

In einer Arbeit von Lee et al. wurde gezeigt, dass die lentiviral-vermittelte Unterdrückung der PI3K α in Monozyten zu stabilen und selektiven Unterdrückungen führte (Lee et al. 2004). Lee beschreibt die Inhibierung als spezifisch in Hinsicht auf die Klasse-I-A-PI3K (PI3K α , PI3K β und PI3K δ). Zur Stabilität in Hinsicht auf die Klasse-I-B-PI3K (PI3K γ) wurden in der Arbeit keine Angaben gemacht. Die unveränderte Expression der PI3K β und PI3K δ nach Unterdrückung der PI3K α konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Zelllinie SK-N-LO- $\alpha 5$ nachgewiesen werden und bestätigte damit die Ergebnisse der Arbeit von Lee et al. Bei der Zelllinie SK-N-LO- $\alpha 5$ wurde jedoch eine unspezifische Unterdrückung der Klasse-I-B-PI3K (PI3K γ) nach mehreren Passagen beobachtet.

Unklar bleibt, weshalb keine stabilen und spezifischen lentiviral vermittelten Unterdrückungen erreicht werden konnten. Mögliche Erklärungen sind aufgetretene *offtargeting*-Effekte hinsichtlich der Unspezifität. Bei der Erklärung der Instabilität der Unterdrückungen können endogene Gegenregulationsmechanismen der transduzierten Zellen sowie ein Proliferationsvorteil von Zelllinien mit schwächerer Expression von shRNA herangezogen werden.

Offtargeting-Effekte betreffen Proteine mit strukturellen Ähnlichkeiten der Target-Proteine. Da bei den ersten Untersuchungen der Unterdrückungen keine Untersuchungen zur Spezifität

vorgenommen wurden, ist nicht auszuschließen, dass die *offtargeting*-Effekte unbeobachtet bereits zusammen mit den Unterdrückungen der *target*-Gene aufgetreten sind. Sie erklären jedoch nicht den Verlust der Unterdrückungseigenschaften nach mehreren Passagen.

Einen weiteren Ansatzpunkt zur Erklärung der fehlenden Stabilität könnten intrazelluläre Regulationsmechanismen zur Abwehr der shRNA darstellen. PI3K treten physiologisch in Zellen auf. Eine gesteigerte Aktivität in onkogenen Prozessen kann u.a. durch veränderte intrazelluläre Prozesse hervorgerufen werden. So wird beschrieben, dass zelleigene miRNAs auf verschiedene Moleküle, u.a. die Enzyme PI3K und PTEN, eine aktivierende oder inhibierende Wirkung ausüben können, die zur Vermittlung von Tumoreigenschaften wie Differenzierung, Apoptose und Proliferation beitragen (*Bueno et al. 2008*). Unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen wäre es denkbar, dass die transduzierten Zellen auf die veränderten Expressionen der PI3K mit Gegenregulationsprozessen reagieren. Eine Anpassung der miRNA-Expression könnte Ursache der Rekonstruktion des ursprünglichen Zustandes mit hohem Expressionsniveau an PI3K sein.

Eine dritte Möglichkeit der Erklärung beinhaltet die Vorstellung, dass Zellen mit weniger effektiver Unterdrückung der PI3K ein schnelleres Proliferationsverhalten zeigen (siehe Kapitel 5.4.1 und 5.4.2). So wäre es denkbar, dass transduzierte Zellen mit geringeren Unterdrückungseigenschaften (z.B. durch Einbau von weniger shRNA-Gen-Kopien und damit verminderte Expression der shRNA) ein schnelleres Wachstum aufweisen und stärker unterdrückende Zellen mit verlangsamer Proliferation verdrängen.

6.2 Zellmorphologische Veränderungen

Nach der Unterdrückung der PI3K β kam es in der Zelllinie SK-N-LO- β 3 zu einem veränderten morphologischen Erscheinungsbild. Die Zellen neigten zu verdichtetem Wachstum, veränderter Größe und Aufgabe des planaren Wachstums. Diese Beobachtungen können auf die Bedeutung der PI3K β in der Organisation des Zytoskeletts von Neuroblastomzellen hinweisen. In der Literatur wird die Funktion von PI3K, zusammen mit den kleinen GTPasen Rac und Cdc42, bei der Kontrolle der Aktin-Dynamik in motilen Zellen beschrieben (*Van Haastert und Devreotes 2004*). Da Aktin als Hauptbestandteil der Aktinfilamente eine Bedeutung im Aufbau des Zytoskeletts hat, ist ein Einfluss der PI3K auf die Zellmorphologie erklärbar.

6.3 Zellphysiologische Untersuchungen

In dieser Arbeit wurde nach Erstellung der Zelllinien das Proliferations- und Apoptoseverhalten untersucht, was im Folgenden besprochen werden soll.

6.3.1 Analyse des Proliferationsverhaltens nach Inhibierung der PI3K α , β , γ und δ in SK-N-LO-Zellen

Das Proliferationsverhalten von Zellen wird durch zwei Prozesse bestimmt. Zunächst erreichen die Zellen durch Wachstum eine kritische Zellgröße. Anschließend kann die Zellteilung, vermittelt durch Zellzyklusproteine, stattfinden. Beide Prozesse werden u.a. über den PI3K-Akt-Weg reguliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferation nach Transduktion der spezifischen shRNA zur Unterdrückung jeder einzelnen der Klasse-I PI3K-Isoformen untersucht. In allen PI3K-inhibierenden Zelllinien (lentiviral und retroviral erstellt) konnten Proliferationsinhibitionen auf 50 – 75 % der Kontrollzelllinie beobachtet werden. Tabelle 10 zeigt die Proliferationsinhibitionen, verglichen mit den *non-targeting*-transduzierten Kontrollzelllinien SK-N-LO-LVcon und SK-N-LO-RVcon.

Zelllinie	SK-N-LO- α 5	SK-N-LO- β 3	SK-N-LO- γ 3	SK-N-LO- γ 4	SK-N-LO- δ 1	SK-N-LO- δ 3	SK-N-LO- γ RV
Relation der Proliferation zur Kontrolle	53 %	78 %	69 %	53 %	54 %	76 %	71 %

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Proliferationsassays nach Unterdrückung der PI3K in SK-N-LO-Zellen. Alle PI3K-unterdrückenden Zelllinien zeigten eine eingeschränkte Proliferation gegenüber den Kontrollzelllinien SK-N-LO-LVcon und SK-N-LO-RVcon. Die Proliferationen konnten auf 50 – 75 % der Proliferation der Kontrollzelllinien gesenkt werden.

Als Ursache der Proliferationsinhibition kommen verschiedene PI3K-vermittelte Mechanismen in Frage. Dabei könnte nach Unterdrückung der PI3K die Proliferationsinhibition sowohl durch vermindertes Zellwachstum und Zellteilung auftreten, als auch eine erhöhte Apoptoserate (siehe Kapitel 5.5) der transduzierten SK-N-LO-Zellen dafür verantwortlich sein. Folgende Mechanismen sind an Zellwachstum und Zellteilung beteiligt:

Die Inhibition von mTOR beeinflusst das Wachstum der Zellen negativ. In der Folge würde die kritische Größe, die Zellen vor der Teilung erreicht haben müssen, später erlangt werden und so die Proliferation verlangsamen. Ein weiterer Mechanismus ist die Aktivierung von GSK3 β bei reduzierter Expression der PI3K mit nachfolgender Degradierung von Zellzyklus-Proteinen (Cyclin D1, c-myc). Bei der Regulation der Zellzyklusproteine spielt auch FOXO eine Rolle, welches bei reduzierter PI3K-Funktion aktiviert wird und die Transkription von Zellzyklus-Inhibitoren (p27^{Kip1} und RBL2) induziert. Durch die ausbleibende Phosphorylierung von MDM2 nach Unterdrückung der PI3K kommt es auf diesem Weg nicht zu einer Degradation des Tumorsuppressorgens p53.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es durch Inhibition jeder einzelnen Klasse-I-PI3K (α , β , γ und δ) zu verminderten Proliferationseigenschaften der SK-N-LO-Zellen kommt. Folglich muss jede der PI3K-Isoformen in den Proliferationsprozess dieser Neuroblastomzelllinie durch einen der oben beschriebenen Mechanismen eingreifen.

Diese Beobachtung erweitert die Erkenntnisse, die durch den Einsatz von Isoform-unspezifischen PI3K-Inhibitoren gewonnen wurden. So konnte in einer Arbeit von Chesler et al. gezeigt werden, dass der unspezifische PI3K-Inhibitor LY294002 im Tiermodell das Wachstum von Neuroblastomzellen aufhalten konnte (Chesler et al. 2006). Die Anwendung des Inhibitors führte zu einer Reduktion der Proliferation der Tumorzellen und Induktion der Apoptose. Das untersuchte Tumorgewebe wies eine Amplifikation des Protoonkogens MYCN auf, was Indikator einer schlechten Prognose der Erkrankung ist. Nach Applikation von LY294002 konnte ein reduziertes Proteinniveau von Mycn in den Zellen nachgewiesen werden. In einer weiteren Studie konnte für die Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y und LAN-1 gezeigt werden, dass durch die isolierte shRNA vermittelte Unterdrückung von PI3K α sowie PI3K δ die Proliferation inhibiert und Apoptose induziert wurde (Boller et al. 2008). Auch Fu et al. beobachteten nach Inhibition von humanem Akt-1 und PI3KR1 in Adenokarzinomzellen und Gliomzellen eine Wachstumsinhibition der Zellen von mehr als 60 %, darüberhinaus wiesen die Zellen ein kleineres Einungsbild und Zellzyklusarrest auf (Fu et al. 2009).

In Arbeiten von Spitzenberg und König (*mündliche Überlieferung*) wurde nach Anwendung des spezifischen Inhibitors der PI3K γ , AS-605240, an verschiedenen Neuroblastomzelllinien, u.a. die hier verwendete Zelllinie SK-N-LO, eine Inhibition des Wachstums bei gleichzeitiger Induktion der Apoptose beobachtet. Eine veränderte Expression der Wachstums-vermittelnden Proteine GSK3, S6K und FOXO konnte nicht festgestellt werden, auch die Phasen des Zellzyklusses zeigten keine Veränderungen. Bei der Applikation von AS-605240

in Neuroblastome von Mäusen konnten Spitzenberg und König ein vermindertes Tumorstadium beobachten, was die *in vitro* beschriebenen Effekte bestätigte.

6.3.2 Analyse des Apoptoseverhaltens nach lentiviraler Inhibierung der PI3K α , β , γ und δ in SK-N-LO-Zellen

Ergänzend zur beobachteten Proliferationsinhibition wurde das Apoptoseverhalten der lentiviral transduzierten Zellen analysiert. Die Signalweiterleitung apoptotischer Prozesse findet u.a. durch die PI3K sowie die nachgeschalteten Proteine statt. So kann es nach Inhibierung der PI3K zu einer Aktivierung des proapoptotischen Proteins BAD und nachgeschalteter Inhibition von antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie kommen. Durch die nach PI3K-Unterdrückung fehlende Inhibition von FOXO unterbleibt die Transkription der antiapoptotischen Proteine FasL und Bim. Die Feststellung einer Induktion der Apoptose kann ergänzend die beobachteten Proliferationsinhibitionen erklären.

Die SK-N-LO-Zelllinien $\alpha 5$, $\beta 3$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, $\delta 1$ und $\delta 3$ wurden auf eine verstärkte Induktion der Apoptose untersucht. Das zugrundeliegende Prinzip dieser Analyse war der Einbau von BrdU an DNA-Doppelstrangbrüchen, die Kopplung von BrdU an den fluoreszierenden Farbstoff FITC sowie die durchflusszytometrische Auswertung der FITC-Signalstärke. Nach Behandlung der Wildtyp-SK-N-LO-Zellen mit STS war eine deutliche Induktion der Apoptose festzustellen (56,80 %). Dagegen konnte in keiner der untersuchten PI3K-unterdrückenden SK-N-LO-Zelllinien deutlich erhöhte Populationen apoptotischer Zellen nachgewiesen werden. Es kam zu einer maximalen Induktion der Apoptose bei der Zelllinie SK-N-LO- $\alpha 5$ (1,85 %). In der Kontrollzelllinie SK-N-LO-LVcon betrug die Apoptoserate 0,34 %. Die Ergebnisse waren reproduzierbar.

In der Literatur wird der Einfluss der PI3K auf das Apoptoseverhalten von Zellen kontrovers diskutiert. So wird die PI3K-vermittelte Apoptoseinhibition als ein Mechanismus beschrieben, der lediglich im Entwicklungsstadium von Bedeutung ist. Bei Untersuchungen am Modell der *Drosophila* wurde festgestellt, dass die PI3K eine Bedeutung für das Apoptoseverhalten in der embryonalen Phase besitzen. In späteren Entwicklungsstadien wird ihre Rolle jedoch eher auf die Regulation der Zellgröße ohne Beeinflussung des Apoptoseverhaltens reduziert (Staveley *et al.*, 1998, Verdu *et al.* 1999). So führt ein Knockout der PI3K α und β in transgenen Mäusen im Fetalstadium zu Letalität. In späteren Stadien der Entwicklung ist eine Inhibition dieser Isoformen ohne eine Bedrohung vitaler Prozesse jedoch möglich.

In weiteren Arbeiten wird beschrieben, dass das Zellwachstum wesentlich sensibler als das Apoptoseverhalten auf Expressionsveränderungen von PI3K-nachgeschalteten Proteinen (Subtypen von Akt) reagiert. So zeigten Mäuse mit einem Knockout von Akt-1 und Akt-2 einen morphologisch kleineren Phänotyp, Atrophie multipler Organsysteme und Störungen im Glukosestoffwechsel, was zu früher neonataler Letalität führt. Dennoch verlief die Entwicklung während der Embryogenese unauffällig und ohne Anzeichen für Apoptose (*Peng et al. 2003*). Ähnliches wird bei Mäusen mit einem Knockout von Akt-2 und Akt-3 beobachtet (*Dummler et al. 2006*).

Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen weiterer Arbeiten hinsichtlich des Apoptoseverhaltens nach Inhibierung von PI3K-Isoformen (*Chesler et al. 2006; Boller et al. 2008; Spitzenberg, König unveröffentlicht*). Chesler et al. konnten nach Applikation des unspezifischen PI3K-Inhibitors Wortmannin an Neuroblastomen in Mäusen eine Induktion der Apoptose feststellen. Auch Spitzenberg, König et al. beobachteten eine Induktion der Apoptose nach Anwendung des PI3K γ -spezifischen Antikörpers AS-605240 an Neuroblastomen in Mäusen. Boller et al. konnten eine erhöhte Apoptoserate in den Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und LA-N-1 nach Anwendung von shRNA gegen die PI3K α und PI3K δ feststellen.

Dass in der vorliegenden Arbeit keine erhöhten Apoptoseraten festgestellt werden konnten, kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann eine Induktion der Apoptose stattgefunden haben, die jedoch außerhalb des Beobachtungszeitraumes lag. Die Messung einer erhöhten Apoptoserate in der Kontrollzelllinie SK-N-LO gelang nach gezielter Einleitung der Apoptose durch Hungern der Zellen und nach Zugabe von STS vor der Messung. Im Gegensatz dazu waren die PI3K-unterdrückenden Zelllinien unverändert in Kultur (einziger zusätzlicher Apoptosereiz war die Kultivierung in serumfreiem Medium). Hätte die Unterdrückung der PI3K einen Effekt auf das Apoptoseverhalten ausgelöst, wäre dieser bereits kurz nach der Transduktion der shRNA bei Unterdrückung der PI3K-Expression aufgetreten. Durch die notwendige anschließende Selektion war eine Analyse PI3K-vermittelter apoptotischer Zellen zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Die Untersuchung des Apoptoseverhaltens erfolgte erst nach Erreichen einer ausreichenden Zellpopulation. So konnten nur Zellen untersucht werden, die während der ersten Tage nicht apoptotisch wurden, stattdessen proliferierten. Mögliche Ursachen dafür wären eine insuffiziente Unterdrückung der PI3K durch eine nicht ausreichende Anzahl an shRNA-Kopien in der Zelle (vergleiche Kapitel 6.1) oder die Aufrechterhaltung der Apoptoseinhibition durch weitere Signaltransduktionswege. Dabei wäre eine Signalweiterleitung z.B. über den

Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg oder den Jak/STAT-Signalweg denkbar. Ein Hinweis auf einen Effekt auf das Apoptoseverhalten unter den transduzierten Zellen ist die gering erhöhte Anzahl an Zellen in Apoptose bei der Zelllinie SK-N-LO- α 5 (1,85 %). Dies war nach Kultivieren in serumfreiem Medium zu beobachten, was für die Zellen einen Stress bedeutet.

Um das Auftreten deutlich erhöhter Apoptoseraten zu überprüfen, wäre es nötig, das Apoptoseassay direkt nach der Transduktion durchzuführen. Da es sich zu diesem Zeitpunkt jedoch um eine Mischkultur aus transduzierten und nicht-transduzierten Zellen handelt, muss zunächst eine Selektion vorgenommen werden. Darüberhinaus ist die Effizienz der Transduktion zu gering, um ein Apoptoseassay anschließen zu können.

Eine weitere Erklärung wäre das Ausbleiben der Apoptoseinduktion nach PI3K-Unterdrückung, z.B. aufgrund alternativer Signalwege, welche die Apoptoseinhibition vermitteln. Da jedoch durch Arbeiten von Spitzenberg, König et al. eine Induktion der Apoptose an SK-N-LO-Zellen nach Anwendung eines spezifischen PI3K-Inhibitors beobachtet wurde, ist diese Erklärung unwahrscheinlich.

So scheint die Methode der shRNA-vermittelten Unterdrückung der PI3K nicht geeignet, um Aussagen zum Apoptoseverhalten der Zellen zu treffen. Die Anwendung von Inhibitoren bietet dazu bessere Möglichkeiten, da auf eine Selektion verzichtet werden und der Zeitpunkt der Analyse – wie bei der Anwendung von STS – genau definiert werden kann. Alternativ kann eine Unterdrückung der PI3K durch transiente shRNA versucht werden, deren Transfektion höhere Effizienz zeigen und eine sofortige Analyse der Apoptose ohne den Schritt der Selektion ermöglichen.

Eine Beteiligung der Apoptoseregulation an der in Kapitel 6.3.1 beschriebenen Proliferationsinhibition nach Unterdrückung der PI3K kann jedoch durch die Negativergebnisse des Apoptoseassay ausgeschlossen werden. Die hier gezeigten Ergebnisse machen deutlich, dass die Proliferationsinhibition durch PI3K-vermitteltes verlangsamtes Wachstum oder Regulation von Zellzyklusproteinen erklärt werden muss. Weitere Untersuchungen von nachgeschalteten Signaltransduktionsmolekülen (mTOR, GSK3 β , FOXO, MDM2) würden zu besserem Verständnis der beobachteten Effekte beitragen.